Глава 4

Реалии и перспективы токсикомоделирования

Вещества, применяемые в медицине, ветеринарии, косметологии, по их влиянию на исполнительные и регуляторные системы можно весьма условно разделить на *агонисты* и *антагонисты*. Независимо от происхождения (минеральные, природно-органические или синтетические), они имеют низкую относительную молекулярную массу (до 500), исключая некоторые медицинские иммунобиологические препараты. Очень многие препараты являются одновременно агонистами–антагонистами, а их эффекты зависят от доз, концентраций и условий применения. К *безусловным агонистам* прежде относили нейромедиаторы, ферменты и коферменты тканевого дыхания, рилизинг-факторы и другие регуляторы природных процессов. Жизнедеятельность живых систем обеспечивается реакциями комплементарных биополимеров с агонистами, а также природными принципами адсорбции (абсорбции), депонирования и выведения.




Но если есть агонисты, то должны быть антагонисты, а, как оказалось, существуют и отдельные представители *заместительной терапии*. С последними более или менее ясно – это та корзина знаний, в которую мы высыпаем все, что до конца не понятно (витамины, гормоны, микроэлементы и т.п.), по принципу замещают, да и все тут! С антагонистами сложнее, поскольку некоторые авторы [1] считают, что большинство лекарств являются антагонистами и ингибиторами природных агонистов. А коль скоро это так, то «токсичность антагонистов является их наиболее ценным свойством, поскольку... служит на благо здоровья человека» [10]. Не обсуждая спорность такого взгляда, согласимся с тем, что для лекарственных воздействий во многих случаях характерна и важна *избирательная токсичность*.

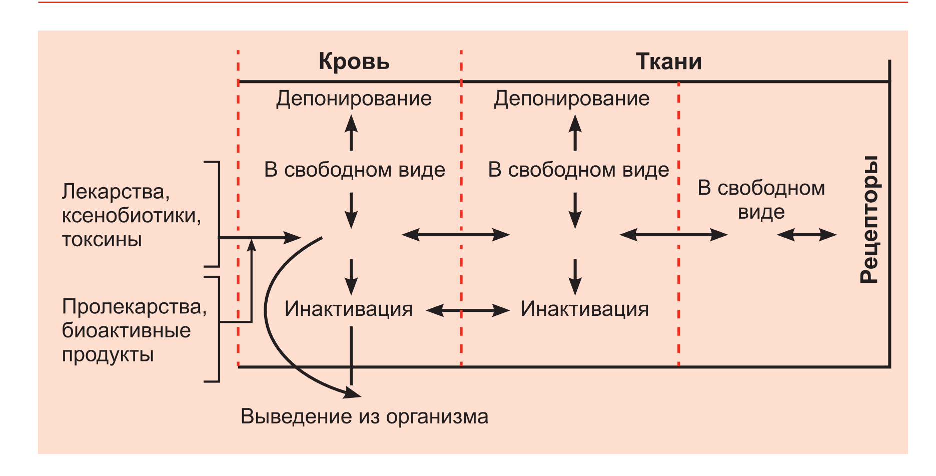


Рис. 4.1. Схема распределения взаимодействия и выведения лекарств, ксенобиотиков, токсинов, с одной стороны, пролекарств или иных биологически активных веществ (например, нутриентов) – с другой. Вертикальным пунктиром обозначены мембраны



Процессы регуляции и факторы избирательной токсичности



Строго определенное воздействие на клеточные пулы одной морфофункциональной организации рассматривается в фармакологии и токсикологии как избирательное. В этом случае при действии, например, на возбудителей инфекционного характера или опухолевые клетки говорят об *избирательной токсичности*. В иных случаях говорят о токсичности лекарств, понимая под этим нежелательные или неблагоприятные побочные эффекты или реакции (НПР). И в том и в другом случае токсические воздействия подразделяют на обратимые и необратимые. Но поскольку в театральном сообществе Природы принято выдавать по два или несколько билетов на одно место, то в живых системах всегда будут присутствовать элементы состязательности за клетки-мишени или их рецепторы. В первом томе [6] мы рассмотрели процессы регулирования в биосистемах. Не повторяясь, дополним их лишь извлечениями из теории Ле Шателье (1880).

NB! Согласно теории Ле Шателье любая система сопротивляется изменениям, а при внешнем воздействии ее равновесие смещается в сторону минимального изменения процессов.

За миллионы лет до появления человека в биосфере нашей планеты развились механизмы регуляции организмов и природные агонисты защиты и саморегуляции. Важнейшими из них являются:



✓ птеридины, регулирующие по типу фолиевой кислоты биосинтез пиримидинов и пуринов;
✓ пуриновые и пиримидиновые основания, входящие в состав ДНК;
✓ аденозинфосфаты, обеспечивающие АМФ-, АДФ- и АТФ-энергетические потребности клеток.

Ранее [6] мы схематично изложили принципы регуляции в биосистемах. Рассмотрим их в приложении к явлениям избирательной токсичности.

Две биосистемы могут быть связаны между собой двумя основными способами. Первый способ – *последовательный*, когда элементы следуют один за другим. Связанные между собой элементы ($x_1 \rightarrow F_1 \rightarrow x_2 \rightarrow F_2 \rightarrow x_3$) по своей реакции на входное воздействие и передаточную функцию могут быть заменены на один элемент, включающий в себя произведение передаточных функций последовательно связанных элементов ($x_1 \rightarrow F_1F_2 \rightarrow x_4$). Второй способ – *параллельный*, когда передаточная функция системы, состоящей из двух элементов (F_1 и F_2), соединенных параллельно, соответствует сумме передаточных функций связанных элементов, то есть ($x_1 \rightarrow F_1 + F_2 \rightarrow x_4$).




На рис. 4.2 приведены схемы обратной связи, на которых можно рассмотреть прикладные моменты различий фармакологических и токсикологических воздействий. Через отрицательную обратную связь часть выходного сигнала x_2 передается через элемент F_2 на вход системы таким образом, что величина входного сигнала при этом понижается до ($x_1 - \Delta x_2$). Через положительную обратную связь часть входного сигнала x_2 передается через элемент F_2 на вход системы таким образом, что величина входного сигнала при этом повышается до ($x_1 + \Delta x_2$).

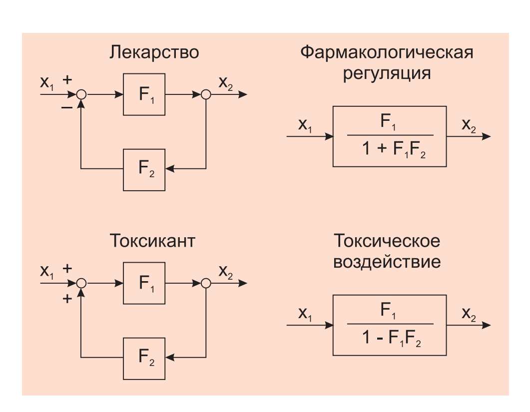


Рис. 4.2. Схемы обратных связей в биомоделировании фармакологических и токсикологических эффектов

Многие исследователи динамических процессов в живых системах справедливо полагают, что именно отрицательная обратная связь является важнейшей для биопроцессов. С этим можно согласиться во многом, но не в отношении токсикологии ксенобиотиков и иных

токсикантов. Например, применение любой заместительной терапии, в частности глюкокортикоидов, приводит, в силу *отрицательной* обратной связи, к подавлению продукции кортикостероидов. Это, конечно, не благо, но это факт. В случае с токсикантами, в более или менее оптимально функционирующем организме, именно за счет *положительной* обратной связи должна нарастающим валом повышаться активность ферментативных систем инактивации вредных агентов и выделения их метаболитов (рис. 4.2, внизу).

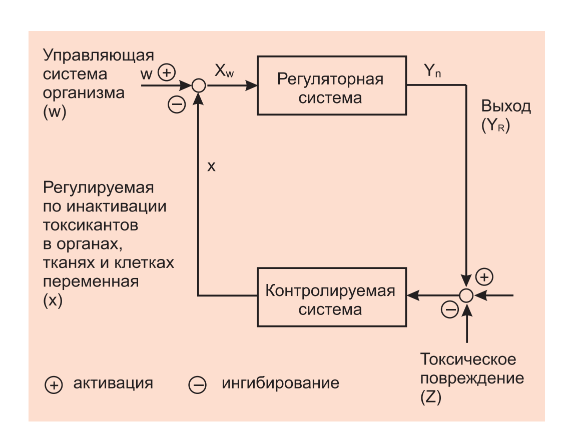


Рис. 4.3. Контур регулирования и управления в системах токсикологического моделирования. (+) – активация, (–) – ингибирование ферментов, когда дозы токсикантов слишком велики




Объяснения регуляторных механизмов обычно строятся на терминологии теории *автоматического регулирования*, то есть на автоматическом поддержании некоторых физических или химических величин в предварительно определенных границах. Регулируемый механизм называется управляемой системой, а механизм, выполняющий регулирование, называется блоком управления или регулятором. Эти две части образуют контур регулирования (рис. 4.3). Регулируемая величина, то есть такая величина, которая изменяется при отклонении системы от заданного состояния (например, стационарного), обозначается x. Из схемы видно, что в данном случае представлен контур регулирования с отрицательной обратной связью, в котором выходной сигнал x вычитается из входного сигнала w.

Сигнал ошибки x_w – это разница между действительной x и требуемой w величиной. Он должен быть как можно меньшим, либо равным нулю. Требуемое значение регулируемой величины задается системе управления посредством *управляющей величины* w. Отсюда следует, что $x_w = w - x$. Возможны случайные и непреднамеренные изменения регулируемой величины под воздействием различных *возмущений* z. Сигнал управления Y_R – это величина, которая так воздействует на управляемую систему, что обеспечивает минимальное отклонение системы от заданного состояния (действие лекарств).



Примером регуляторов в биологических системах может стать инактивация токсикантов. Первый фермент в мультиферментных системах биотрасформации является обычно регулятором. Поскольку аллостерические ферменты часто участвуют в регулировании (регуляторные ферменты), роль сигнала управления (α) играет эффектор (положительный – активатор, отрицательный – ингибитор) (рис. 4.4).

Кинетика ферментативных реакций в отношении токсиканта протекает в присутствии эффектора и характеризуется графически либо сигмоидной кривой, либо изменением наклона кривой в присутствии эффектора. Таким образом, закон действующих масс (Гульдберг-Вааге) подчеркивает механизм обратной связи (*ср.* рис. 4.3 и 4.4).





Аденилаты (АМФ, АДФ, АТФ) относятся к хорошо известным регуляторам биологических систем. Для протекания реакций, катализируемых ферментами, наиболее важными факторами являются общее количество аденилатов и взаимная связь между индивидуальными компонентами [25]. АМФ функционирует как положительный эффектор, стимулируя активность ферментов. Это отражает ключевое положение АМФ в регуляции превращения субстратов и энергии в живых организмах. Так, АМФ стимулирует активность: а) фосфофруктокиназы; б) цитратсинтазы; в) изоцитратдегидрогеназы; г) фумаразы. АТФ ингибирует все вышеперечисленные реакции (в особенности (б) и (в)).

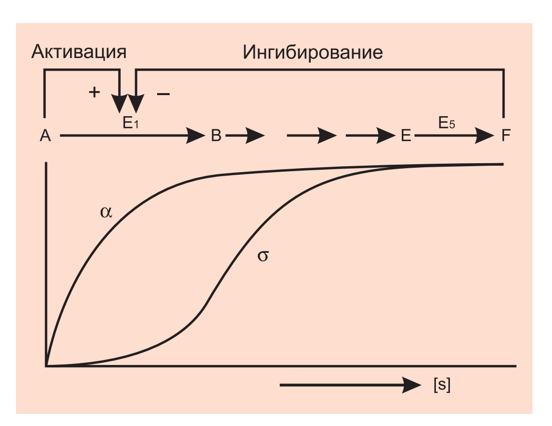


Рис. 4.4. Кинетика аллостерических или регуляторных ферментов в процессе биотрансформации токсикантов и некоторых лекарств. A – субстрат, F – продукт, B-E – промежуточные соединения, E_1 – E_5 – ферментативные системы

Скоростьлимитирующие процессы являются важной составляющей метаболизма лекарств, токсикантов и их токсикокинетики. Серия последовательных реакций может включать одну реакцию (k_2), которая *лимитирует* весь процесс (рис. 4.5, *C*). Эта реакция называется контролирующей и скоростьлимитирующей реакцией. Ферменткатализируемая реакция, протекающая при насыщающей концентрации субстрата в условиях стационарного состояния, может быть скоростьлимитирую-

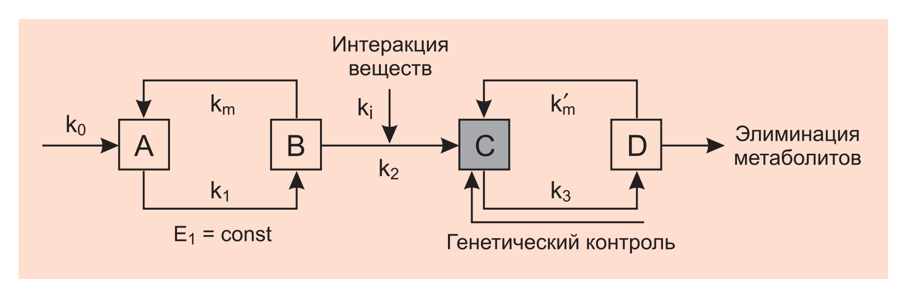


Рис. 4.5. Контур регуляции в скоростьлимитирующих (блок *C*) процессах биотрансформации лекарств, ксенобиотиков и токсикантов

щей реакцией. При выполнении перечисленных условий регуляторную роль в серии последовательных ферментативных реакций может проявлять реакция с самым низким значением k'_m (рис. 4.5). Иными словами, процессы детоксикации работают на разных этапах по принципам и положительной и отрицательной обратной связи, которые, несомненно, находятся под *генетическим контролем*.




Когда запас энергии достаточен, то, благодаря наличию *агонистов саморегуляции*, геном любой клетки или целостного организма эффективно поддерживает свой *гомеостаз*, противодействуя любому вмешательству. На воздействие любого агониста организм реагирует в виде реакций или иных проявлений *избирательной токсичности*. Существуют, покрайней мере, *четыре вида основных факторов* избирательной токсичности (ИТ).

Первым фактором ИТ выступает селективное или преимущественное накопление лекарств или ксенобиотиков в специфических морфологических структурах (костная, жировая ткани, паренхиматозные органы, мозг, опухоли, воспаленные ткани и т.д.), например, *A* на рис. 4.5.

Вторым фактором ИТ являются различия в строении клеток человека, животных, микроорганизмов, прионов, вирусов, то есть этот фактор связан с цитологическими основами взаимодействия лекарств, токсинов и ксенобиотиков, например, *B* на рис. 4.5.

Третьим фактором ИТ для лекарств и ксенобиотиков является генетический полиморфизм как у человека, так и у животных, наличие или отсутствие в геноме систем управления ферментативными реакциями, например, *C* на рис. 4.5. Следствием данного фактора может быть относительная или абсолютная непереносимость лекарств как отдельными индивидуами, так и целыми этносами.

Четвертым фактором ИТ становится интеракция (k_i) лекарств и ксенобиотиков между собой и друг с другом. Изменение эффекта одного вещества под воздействием другого приводит и к изменению токсич-



ности каждого из них, независимо от того в какой из фаз произошло это взаимодействие: в фармацевтической, фармакокинетической или фармакодинамической (рис. 4.5, *C* и *D*) или при элиминации.

Если предпосылки, обосновывающие первые три фактора ИТ достаточно понятны, то на четвертом следует остановиться подробнее. Его участие в избирательной токсичности означает не только одновременное введение двух и более веществ в эксперименте или клинике. Мы зачастую забываем, что пищевые продукты являются источником огромного числа агонистов для различных рецепторов. *Конкурентные антагонисты* имеют общее с агонистами сродство к рецептору и способны конкурировать с ними за рецептор.

NB! Во многих случаях только часть рецепторов занимается молекулами лекарств или токсинов. В организме всегда имеется резерв рецепторов, с которым взаимодействуют обратимые неконкурентные антагонисты. Вещества, обладающие бо́льшим сродством к рецептору, действуют как конкурентные антагонисты.




Если представить себе, что в качестве рецептора выступает любая ткань, орган или клетка, с которой взаимодействует лекарство, то становится очевидной связь его фармакодинамических, фармакокинетических и токсикологических характеристик. Эту связь легко проследить на приведенных схемах (рис. 4.1–4.5).

Сложность оценки токсичности лекарств заключается и в том, что, по мнению многих авторов [1, 5, 8, 10, 26, 28], большинство из них являются на самом деле *пролекарствами*, а большинство токсикантов, введенных в организм в том или ином виде, взаимодействуют с рецептором в неизменном виде. Так, если фосфорорганические соединения ингибируют ферменты путем ковалентной связи, то большинство других связываются с рецептором в соответствии с законом действующих масс и описываются уравнениями Ленгмюра для изотерм адсорбции.

Оккупационная теория и процедуры токсикотестирования

Рассматривая взаимодействие любых веществ с тканями, легко представить его в виде занятых ими комплексов реакционно-активных групп. Подобное явление описывается в рамках простой *оккупационной теории*. И. Ленгмюр показал четкую взаимосвязь физики и химии в таких взаимодействиях. После его работ стала понятна суть явления адсорбции, обусловленного суммой всех химических связей (ван-дер-ваальсовых, водородных, ионных, ковалентных, электростатических и т.д.).

Согласно Ленгмюру, если при адсорбции не происходит образование ковалентных связей, то это – обратимый процесс, когда положение

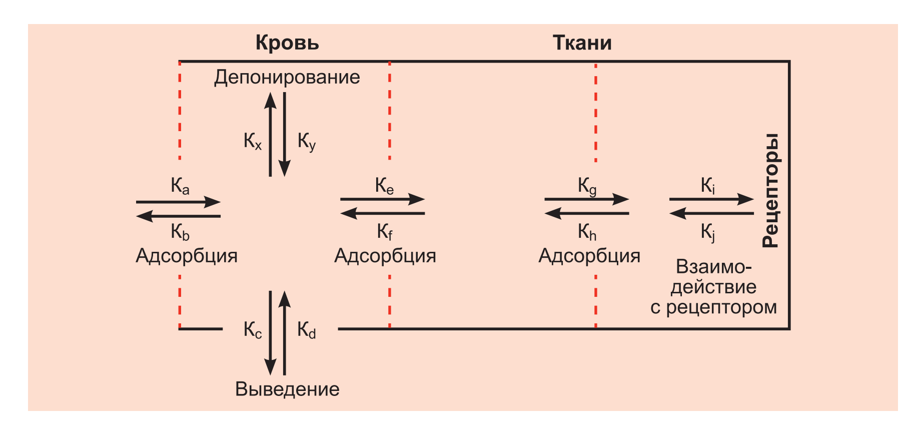


Рис. 4.6. Количественные аспекты адсорбции, распределения и комплементарности агонистов с рецепторами и выведение лекарств и токсинов

его равновесия устанавливается в соответствии с законом действующих масс (рис. 4.6). Из этого закона Ленгмюр вывел уравнение:

$$\frac{X}{m} = \frac{abc}{1+ac},$$




где X – масса адсорбированного вещества, m – масса адсорбента, c – концентрация неадсорбированного вещества, a и b – константы.

Это уравнение показывает, что адсорбент насыщается при высоких значениях c. Если $c > 1$, то правая часть уравнения равна b. Мы привели некоторые представления из оккупационной теории и уравнение Ленгмюра потому, что они поясняют, почему при каждом последующим *удвоении дозы лекарств* их фармакологический эффект становится все менее ощутимым, а *токсический возрастает*. При этом кривая зависимости эффекта от дозы представляет собой гиперболу для ксенобиотиков, лекарств и токсикантов (см. рис. 4.4).

NB! Для многих лекарственных средств характерна следующая закономерность: при условии полной обратимости токсического действия и избирательности действия они тем *ценнее*, чем *токсичнее*. Не парадокс ли?

Нет, данное заключение отнюдь не парадокс, а фармакологический факт не только для онкопрепаратов, противовирусных и антимикробных средств, но и для кардиотропных, нейротропных и иных лекарств. Эти примеры можно продолжить, но обратимся к природной стороне лекарственной токсикологии. На протяжении последних десятилетий идет жаркий спор о большей адекватности животных и альтернативных моделей для токсикомоделирования.



Впервые в нашей стране на первом Съезде токсикологов в 1987 году, председателем которого был избран автор этой книги, была выделена самостоятельная секция по *альтернативным методам токсикомоделирования*. На секции были обсуждены возможности замены экспериментов на животных альтернативными методами при изучении механизмов токсического действия веществ и принята резолюция Съезда о разработке методических рекомендаций и их внедрении в научно-практическую деятельность учреждений и организаций страны [6]. Это дало первый толчок к пересмотру устоявшихся и довольно архаичных взглядов на оценку токсичности лекарств в нашей стране.

Важность такого шага заключалась и в том, что в странах Европы и США главной целью тестирования на токсичность является классификация химических средств в соответствии с присущей им токсичностью, согласно Директиве 67/548/EEC [17]. Это требование связано с необходимостью защитить здоровье населения при регулярном соприкосновении с потенциально опасными материалами, оценкой токсичности биологически активных веществ, ксенобиотиков, токсикантов, а также потенциальных лекарственных средств и средств медицинского назначения.




Поскольку в «*Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*» [9] достаточно полно описаны методические рекомендации и указания по использованию традиционных методов оценки общетоксического действия лекарственных средств, мы не будем приводить здесь эти данные. Рассмотрим лишь наиболее перспективные направления оценки токсичности, в первую очередь лекарств, общепринятые в мировой практике.

NB! Токсичность – это параметры веществ или лекарств, способных при попадании в определенных количествах, обычно превышающих лечебные, в организм человека или животного вызывать их отравление или гибель. Этот параметр характеризует безопасность лекарств.

Наибольшее распространение при оценке безопасности лекарственных препаратов имеет «терапевтический индекс» – показатель, представляющий собой соотношение дозы, вызывающей фармакологический эффект у 50% животных (ED_{50}), и дозы, вызывающей гибель 50% животных (LD_{50}). Брокк и Шнейдер в 1982 г. предложили использовать индекс, который равен отношению дозы препарата, вызывающей токсический эффект у 10% животных (LD_{10}), к дозе, оказывающей фармакологическое действие у 90% животных (ED_{90}). Вычисленный подобным образом терапевтический индекс может свидетельствовать о терапевтической широте препарата. Чем выше этот показатель, тем безопаснее применение препарата в клинике [2, 5].

Классификация химических средств до последнего времени основывалась на оценке средней летальной дозы (LD_{50}), определенной как статистически достоверная доза вещества, при которой может последовать гибель 50% животных экспериментальной группы.

Концепция LD_{50} впервые была введена в 1927 г. для установления токсичности биологически активных компонентов, подобных дигоксину [20]. С того времени и до конца 70-х гг. тест на LD_{50} был раскритикован как с позиций науки, так и с позиций защитников животных [12, 61], и процедура тестирования была модифицирована, что позволило снизить моральный ущерб от использования животных [11]. Эта модификация классического теста LD_{50} включает процедуру фиксированной дозы (Fixed Dose Procedure – OECD TG 420; [36] метод определения класса острой токсичности (Acute Toxic Class method – OECD TG 423; [37]) и процедуру «вверх-и-вниз» (Up-and-Down Procedure – OECD TG 425;). В 2002 г. из руководства OECD был временно исключен оригинальный тест (OECD TG 401) [33].

NB! До настоящего времени, тем не менее, не существует полностью отлицензированных альтернативных методов, способных заменить использование животных при определении токсичности.




Список тестов *in vitro*, представленный в этой главе, не может быть применен для оценки токсичности веществ как единственный принцип, но он становится хорошей альтернативой, если включается в ряд других подходов или батареи тестов. Такая стратегия должна включать батареи тестов, изучающих цитотоксичность, метаболизм, токсикокинетику и определение токсичности для отдельных конкретных органов [38, 40], но с последующей оценкой на животных.

Валидация альтернативных моделей важна для поиска системных точек в таких экспериментах, как субхроническая токсичность и развивающаяся и репродуктивная токсичность. Мультицентровые оценки цитотоксичности *in vitro* (Multicentre Evaluation of *In Vitro* Cytotoxicity –MEIC) показали, что тесты на определение цитотоксичности дают приблизительно одинаковые результаты в отношении действия веществ на клеточные культуры, их рост и жизнеспособность. Анализ данных MEIC также показал, что в ряде случаев более предпочтительно использовать в тестировании клетки животных и человека.

Животные-модели в токсикологии

Определяющим принципом при оценке острой токсичности является минимизация количества животных при исследовании химических, биологических или минеральных соединений. *Общепринятый прием*



оценки LD_{50}, в соответствии с Системой глобальной гармонизации (Globally Harmonised System – GHS) [53], предусматривает интервалы достоверности, ранжирования и классификации субстанции. *Базовым методом* является *процедура фиксированной дозы*, с общепринятым обозначением TG 420 (Test Guideline, Руководства по тестам), для условий перорального введения веществ.

NB! Острая токсичность – это когда введенное в однократной или многократных дозах в течение 24 ч вещество нарушает функции, морфологическую картину органов и приводит к гибели животных.

В соответствии с тестом TG 420 в исследование включают группы животных предпочтительно одного пола, обычно самок, получающих дозы препарата в ступенчатой процедуре. Предпочтительный вид грызунов – крыса, которой проверяемая субстанция вводится в одинарной дозе через желудочный зонд. Допускается дробное введение субстанции небольшими частями, в течение периода, не превышающего 24 часа. Используются фиксированные дозы по 5, 50, 300 и 2000 мг/кг, а в отдельных случаях может быть исследована доза в 5000 мг/кг.





Первоначальный уровень дозы выбирают исходя из основанного на данных *in vivo* или *in vitro* уровня, при котором наблюдаются сразу несколько симптомов токсичности без явных эффектов отравления или летального исхода. Если такой информации нет, то стартовая доза принимается равной *300 мг/кг*. Следующие группы животных могут получать более высокие или низкие дозы в зависимости от наличия или отсутствия симптомов отравления. Эта процедура продолжается до тех пор, пока не будет определена доза, вызывающая отравление.

Животные наблюдаются ежедневно на протяжении 14 дней, в течение которых фиксируются изменения кожи и меха, глазных и слизистых мембран, дыхательной, кровеносной, вегетативной и центральной нервной системы, соматомоторной активности и поведения особей. Отмечается явление тремора, конвульсий, слюноотделения, диареи, летаргии, сонливости и комы. В эксперименте должны быть учтены принципы и критерии, включенные в документ «Human Endpoints Guidance Document» [35]. Вес каждого конкретного животного, включенного в эксперимент, должен быть определен до и после введения субстанции. Обязательным условием должно быть проведение патоморфологических исследований.

Выбор животных-моделей для исследований и особенно оценки воздействия различных факторов физического, химического или биологического генеза является ключевой проблемой при планировании, проведении и анализе результатов. Ранее мы приводили необходимые материалы для исследователей, которые ищут наилучшие способы и

формы организации экспериментов [5], но хотели бы еще раз обратить внимание на таблицу 4.1.

Хотя в ней приводятся модели, ставшие уже классическими при проведении экспериментов, вызванных воздействием фармакологических или иммунотропных средств, химических веществ, воздействия физических факторов, однако наиболее важными и приемлемыми являются биомодели, полученные с помощью генетических подходов в создании инбредных, гибридных, конгенных, мутантных, трансгенных, нокаутных и иных линий (см. гл. 1 и 2).

Таблица 4.1

Генетически обусловленные и экспериментальные модели для оценки острой и хронической токсичности фармакологических веществ, общетоксического действия ксенобиотиков, специальных средств защиты и радиопротекторов




Исследуемое действие вещества	Лабораторные животные				
	Вид	Линия или порода	Пол	Вес	Возраст
Биомодели для оценки общетоксического действия веществ					
Биомодель хлороформного поражения (в минимальных дозах) почек с летальным исходом. Применима для исследований большинства галогенсодержащих соединений	Мыши	Линии: A/WySnKl CBA/CaLac CBA/LacY DBA/2JY	♀♂ ♀♂ ♀♂ ♀♂	30-40 г « « «	3-10 мес. « « «
Биомодель озоновой интоксикации (LD_{100}-34-36 ppm/г)	Мыши	A/WySnKL BALB/cJLac	♀♂ ♀♂	30-40 г «	3-10 мес. «
Биомодель высокой резистентности к токсическому действию хлороформа и галогенов	Мыши	C57BL/6J C57L/JY	♀♂ ♂	30-40 г «	3-10 мес. «
Гиперчувствительная биомодель токсического действия трихлорфторметана и других хлор- и фторсодержащих интоксикантов и ксенобиотиков	Хомяки	Линия: 82...2	♀♂	120 г	6-18 мес.
Модели для оценки общетоксического действия биологически активных средств и фармпрепаратов	Мини-свиньи Собаки Мыши Крысы Кролики	Светлогорские (СМС) Английский бигль Гибриды F1(CBAЧC57B1/6J) Аутбредные и/или линии Wistar Порода «Шиншилла»	♀♂ ♀♂ ♀♂ ♀♂ ♀♂	40-50 кг до 14 кг до 25 г до 250 г до 2,5 кг	8 мес-2 года 8 мес. - 2 года 2-3 мес. 2-3 мес. 4-6 мес.





Таблица 4.1 (*продолжение*)

Исследуемое действие вещества	Лабораторные животные				
	Вид	Линия или порода	Пол	Вес	Возраст
Модели для оценки острой токсичности БАВ, ФАВ и фармпрепаратов	Мыши	Гибриды F1(СВАЧС57В1/6J)	♀♂	18-20 г	2-2.5 мес.
	Крысы	Аутбредные и/или линии Wistar	♀♂	до 250 г	2-3 мес.
Модели для оценки хронической токсичности БАВ, ФАВ и фармпрепаратов	Крысы	Аутбредные или линии Wistar	♂	150-200 г	2-3 мес.
	Мини-свиньи	Светлогорские	♀♂	40-50 кг	8 мес. - 2 года
	Собаки	Английский бигль	♀♂	7-14 кг	8 мес. - 2 года
Влияние на ЦНС	Мыши	Гибриды F1(СВАЧС57BL/6J)	♂	18-25 г	2-3 мес.
		C57B1/6j	♂	17-24 г	2-3 мес.
	Крысы	Белые аутбредные	♂	до 250 г	2-3 мес.
		Линии Wistar	♂	120-200г	2-2.5 мес.
Биомодели для исследования антидотов и комплексонов, применяемых для защиты организма от поражающего действия радиоактивных веществ					
Этапы изучения: Этап 1. Предварительный отбор препаратов (введение изотопа однократно при любой аппликации)	Крысы	Белые аутбредные	♂	180-220 г	2,5-3 мес.
	Мыши	Белые аутбредные	♂	18-22 г	2-2,5 мес.
Этап 2. Детальное исследование эффективности	Крысы	Белые аутбредные	♀♂	160-250 г	2-4 мес.
	Мини-свиньи	Светлогорские (СМС)	♀♂	40-50 кг	8 мес. - 2 года
	Собаки	Аутбредные	♀♂	8-12 кг	1-7 лет
Определение зависимости доза-эффект. Исследование с введением фиксированной дозы токсиканта (не менее двух животных обоего пола в группе)	Мыши	Белые аутбредные	♀♂	40-50 г	3-10 мес.
	Крысы	Аутбредные	♀♂	300-350 г	5-12 мес.
	Кошки	Аутбредные	♀♂	3-5 кг	1-7 лет
	Мини-свиньи	Светлогорские (СМС)	♀♂	40-50 кг	8 мес. - 2 года
	Собаки	Аутбредные	♀♂	10-25 кг	1-7 лет
Оценка антидотной активности при внутримышечном (внутривенном) поступлении токсиканта	Мыши	Белые аутбредные	♀♂	18-22 г	2-2,5 мес.
	Крысы	Белые аутбредные	♀♂	180-200 г	2,5-3 мес.





Таблица 4.1 (*продолжение*)

Исследуемое действие вещества	Лабораторные животные				
	Вид	Линия или порода	Пол	Вес	Возраст
Оценка эффективности антидотов при пероральном поступлении токсиканта	Мыши Крысы	Белые аутбредные Белые аутбредные	♀♂ ♀♂	18-22 г 180-200 г	2-2,5 мес. 2,5-3 мес.
Оценка эффективности антидота при ингаляционном поступлении токсиканта	Крысы	Белые аутбредные	♀♂	180-200 г	2,5-3 мес.
Оценка антидотной активности при накожном поступлении токсиканта	Крысы Мыши Морские свинки Кролики	Белые аутбредные Белые аутбредные Аутбредные Аутбредные Порода «Шиншилла» или альбиносы	♀♂ ♀♂ ♀♂ ♀♂	180-200 г 18-22 г 200-300 г 2,5-3 кг	2,5-3 мес. 2-2,5 мес. 22-27 сут. 6 мес. – 3 года
Определение острой токсичности и широты терапевтического действия средств и фармпрепаратов и этапы изучения					
Этап 1. Исследование на грызунах (введение 4-5 доз однократно, перорально и парентерально	Мыши Крысы	Белые аутбредные Белые аутбредные	♀♂ ♀♂	40-50 г 300-350 г	3-10 мес. 5-12 мес.
Этап 2. Исследования на не-грызунах (введение 2 доз, однократно)	Мини-свиньи Собаки	Светлогорские (СМС) Аутбредные	♀♂ ♀♂	40-50 кг 10-25 кг	8 мес. - 2 года 1-7 лет
Изучение фармакокинетики	Мини-свиньи	Светлогорские (СМС)	♀♂	40-50 кг	8 мес. - 2 года
Исследование зависимости концентрации препарата в плазме крови от времени после его введения	Собаки	Аутбредные	♀♂	15-20 кг	1-7 лет
Изучение общей фармакологической активности, влияния на основные системы жизнеобеспечения организма	Мыши Крысы	Белые аутбредные Белые аутбредные	♀♂ ♀♂	40-50 г 300-350 г	3-10 мес. 5-12 мес.
Биомодели для исследования антидотов и радиопротекторов					
Первичный отбор	Мыши	Линии C57B16 CBA	♂	18-24 г	2-2,5 мес.
Изучение радиопротекторных свойств. Предварительная оценка их безопасности	Мыши Крысы Хомячки	Белые аутбредные Белые аутбредные Аутбредные	♂ ♂ ♂	40-50 г 300-350 г 100-150 г	3-10 мес. 5-12 мес. 6-18 мес.







Таблица 4.1 (*окончание*)

Исследуемое действие вещества	Лабораторные животные				
	Вид	Линия или порода	Пол	Вес	Возраст
Изучение радиопротекторных свойств. Предварительная оценка их безопасности	Собаки	Аутбредные	♂	8-12 кг	1,5-5 лет
	Обезьяны	Аутбредные	♂	Ср.вес	Взрослые особи
	Мини-свиньи	Светлогорские (СМС)	♂	20-30 кг	Взрослые особи
Этап 1. Изучение фармакодинамики, безвредности и механизма радиозащитного действия	Мыши	Белые аутбредные	♂	40-50 г	3-10 мес.
	Крысы	Белые аутбредные	♂	300-350 г	5-12 мес.
Этап 2. Оценка безопасности препаратов	Собаки	Аутбредные	♂	8-12 кг	1-7 лет
	Обезьяны	Аутбредные	♂	Ср.вес	Взрослые особи
	Мини-свиньи	Светлогорские (СМС)	♂	20-30 кг	Взрослые особи
Высокочувствительные биомодели для изучения последствий действия проникающей радиации	Мыши	Линии BALB/cLacY, DBA/2JYJLac	♀♂	30-40 г	3-10 мес.
Биомодель чувствительности к облучению рентгеновскими лучами:					
$LD_{50:30}$ менее 650	Мыши	Линии BALB/cj, A/J, RF/J, SWR/J, C57BL/6J,AHeJ	♀♂	30-40 г	3-4 мес.
$LD_{50:30}$ более 650	Мыши	CBA/J, C3HeB/J, SJL/J, C57BR/J, 129/J	♀♂	30-40 г	3-4 мес.




Еще раз подчеркнем, что экспериментатор должен руководствоваться собственными целями и задачами при выборе той или иной биомодели, но хорошо знать о наличии альтернатив.

Мини-свиньи в токсикологии

В середине 1980-х мини-свиньи были введены в эксперименты по токсикологии как альтернатива видам *не-грызунов*. Основной причиной для введения была реализация многих биохимических, анатомических и физиологических черт, схожих с человеком, относительно других видов не-грызунов [3, 51]. Их использование расширяется в более детальные области, где мини-свиньи могут быть использованы для токсикологических исследований и тестов на токсичность. В дальнейшем изложении мы основывались на собственных данных Центра РАМН, отечествен-





ных и зарубежных публикациях, особенно работах Ove Sveden [51], которому мы выражаем свою признательность.

Существует растущий интерес к мини-свиньям, так как они имеют бóльшую долю сходства с человеком по анатомическим и физиологическим особенностям, чем другие виды не-грызунов. Особое сходство с человеком имеют кожа, сердце и почки. Они также являются доступными высококачественными SPF линиями животных. Имеются преимущества перед традиционными видами не-грызунов, касающиеся этических проблем использования животных в биомедицинских исследованиях. Было показано, что мини-свиньи отзывчивы на широкий спектр лекарств и химических веществ.

NB! Мини-свиньи могут быть использованы для всех процедур администрирования, таких как оральные или парентеральные, и во многих случаях имеют преимущества перед собаками и приматами по метаболическим и фармакологическим причинам.

Научные, экономические и социологические причины делают мини-свиней хорошей токсикологической и фармакологической моделью.





***Светлогорские мини-свиньи* (*СМС*)** являются анатомически и физиологически нормальными животными – в их генотипе отсутствуют гены карликовости, но они отселектированы на малые размеры и небольшую массу тела. Эти количественные признаки закреплены в генотипе светлогорских свиней в результате сложного *кроссбридинга*, а также последующего отбора на протяжении ряда поколений. При создании популяции была использована отдаленная гибридизация свиней «шведский ландрас», геттингенских, вьетнамских черных свиней «Й», диких кабанов европейского и среднеазиатского подвидов [3].

Генетический статус СМС. В популяции сложился своеобразный генофонд как в локусах групп крови (A, B, D, G, F, K, L, M, H, J), так и во впервые исследованных иммуногенетических системах сывороточных белков (AM, IgGY, Lpb, Lpr и др.). Выявлены маркерные аллели в гомозиготных и гетерозиготных генотипах, которые характерны только для исходных форм свиней. По большинству локусов групп крови (D, E, F, K, L, H) доминируют гены вьетнамских свиней и диких кабанов. Например, аллели $L^{aegmnops}$ в генной концентрации 0,5, F^{ac} – 0,54, L^{adhi} – 0,42 (локусы E, F, L) вьетнамских свиней, аллели $E^{edghgmnt}$, L^{adhil} – 0,083 дикого среднеазиатского кабана, а аллели $E^{hdgkmps}$ – 0,25, L^{bdfi} – 0,29 – европейского кабана. На стадии элиминирования в популяции находится маркерная аллель свиней породы ландрас $E^{edfhkmnps}$. Частота ее составляет всего 0,042, а аллель L^{bcgi}, которая также характерна для этой





породы, не найдена вовсе. Выявлен надежный генетический маркер светлогорских свиней – B^b (локус B).

У других исходных животных этот маркер отсутствовал. Иммуногенетический мониторинг позволяет направленно регулировать селекционные процессы с целью сохранения ценных маркерных аллелей в популяции. Изучалась фенотипическая экспрессия следующих генетических локусов (их полиморфизм описан в популяциях домашних свиней): глюкозофосфатизомеразы (ГФИ), 6-фосфоглюконатдегидрогеназы (6-ФГД), эстеразы Д (ЭСТ Д), аденозиндеаминазы (АДА), фосфоглюкомутазы (ФГМ 2). Выборочно тестировали мономорфные локусы изоцитратдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, глутаматоксалоацетаттрансаминазы, диафоразы, по которым аллельных вариантов не выявлено. У исследованных животных описан полиморфизм по локусам 6-ФГД, АДА. В локусе ГФИ зафиксирована аллель $ГФИ^B$, обладающая низкой электофоретической подвижностью, в локусе ЭСТ Д – аллель ЭСТ $Д^A$ с высокой электрофоретической подвижностью, в локусе ФГМ – аллель $ФГМ^B$. По сравнению с исходной сибирской популяцией утрачена аллель ЭСТ $Д^B$, встречавшаяся с частотой 0,19.



NB! В целом по всем исследованным локусам популяция СМС находится в генетическом равновесии, что является показателем ее консолидированности и оптимальности для фармакотоксикологии.



Для использования мини-свиней в биологических экспериментах необходимо знать уровень их генетической гетерогенности. Светлогорские мини-свиньи отличаются высокой генетической гетерогенностью из-за сложного воспроизводительного скрещивания, но по некоторым локусам крови уровень гетерогенности невысок, что указывает на интенсивное применение *инбридинга* при селекции. В целом мини-свиньи обладают характерным спектром генетической изменчивости, позволяющим дифференцировать их от других пород.

У мини-свиней светлогорской популяции исследовали *генетический полиморфизм* трансферина и церулоплазмина. Генетический детерминированный полиморфизм трансферина проявляется в различной электрофоретической подвижности алломерных форм. У *СМС* каждая из аллелей трансферина обнаруживается в виде трех основных полос. Встречаются четыре кодоминантных аллели, контролирующие полипептидную цепь трансферрина. Наиболее часто встречается генотип BB (0,97), остальные гомозиготные генотипы (AA, CC, DD) встречаются приблизительно с одинаковой частотой (около 0,005). Гетерозиготные формы трансферина у светлогорских мини-свиней имеют большую вариабельность полос, и определить гомозиготный генотип трансферрина весьма сложно.

Исследование электрофоретических фенотипов церулоплазмина у этих же мини-свиней показало, что переносящий медь гликопротеид плазмы – церулоплазмин существует в трех фенотипических вариантах. Эти варианты обладают различной электрофоретической подвижностью и хорошо различимы. Церулоплазмины у светлогорских мини-свиней детерминированы двумя кодоминантными аллелями. Частота встречаемости из 180 исследованных сывороток мини-свиней такова: Cp^1/Cp^1 – 0,01; Cp^2/Cp^2 – 0,97; Cp^1/Cp^2 – 0,02. Это дает основание считать, что наличие двух генов, контролирующих формирование полипептидных цепей церулоплазмина в некоторых случаях, может быть использовано при селекции светлогорских мини-свиней. В качестве генетического маркера наиболее пригоден довольно редко встречающийся ген Cp^1, так как наличие его в гомозиготном состоянии у производителей дает дополнительную возможность проследить генеалогию всего семейства и установить степень родства.

Изучение иммуногенетических показателей и некоторых ферментов метаболизма ксенобиотиков разновозрастных самцов (от 7 дней до 60 месяцев) показало, что в возрастном аспекте у животных отмечается параллелизм изменений количества клеток иммунной системы (лейкоциты, Т-лимфоциты) и уровня ферментов метаболизма ксенобиотиков (цитохром Р-450, глутамин-S-трансфераза).




Гематологические и биохимические параметры СМС. Сывороточный белок содержится в концентрации 75±5,20 г/л, глюкоза 68,10±4,89 мг/%, общие липиды 614,9±32,72 мг/%, холестерин 2,2±0,12 ммол/л, эндогенный этанол 1,9±0,20 мг/%, лактат 22,4±2,89 мг/%. Определенный интерес для селекционной работы представляет установление связи между живой массой и некоторыми показателями крови. Были установлены небольшие положительные корреляции между живой массой и концентрацией белка ($r = 0,2$), глюкозы ($r = 0,1$), общих липидов ($r = 0,3$). Аналогичные данные были получены в опытах на свиньях мини-леве.

Интересно отметить отрицательную корреляцию между содержанием общих липидов и холестерина в крови ($r = -0,6 \pm 0,12$; $P \leq 0,01$). Полученные данные могут иметь значение при продолжении работы по моделированию атеросклероза и алкоголизма на мини-свиньях светлогорской популяции.

Необходимым условием для проведений ряда экспериментов является изучение показателей жидкой среды организма, в частности крови. Гематологические показатели мини-свиней светлогорских популяций в норме не сильно отличаются от таковых у мини-свиней других пород и популяций (табл. 4.2).



Таблица 4.2

Половозрастная динамика гематологических показателей у мини-свиней светлогорской популяции

Возраст	Пол	Гематокрит, %	Гемоглобин, г %	Лейкоциты, тыс.	Эритроциты, млн.	Цветной показатель
		M±m	M±m	M±m	M±m	M±m
2 недели	♂	39,2±1,34	9,75±0,59	9,3±1,15	6,86±0,70	0,85±0,08
	♀	38,5±1,46	11,0±0,38	12,5±1,33	6,19±0,26	1,07±0,07
1 месяц	♂	40,1±0,74	10,6±0,60	22,6±1,40	7,02±0,53	0,90±0,11
	♀	43,5±2,51	12,1±0,56	17,4±1,62	7,82±0,50	0,93±0,10
3 месяца	♂	40,9±0,85	10,3±0,51	21,6±2,02	6,47±0,46	0,96±0,04
	♀	39,0±1,81	10,4±0,64	20,1±1,98	6,35±0,48	1,01±0,11
6 месяцев	♂	52,5±0,97	11,8±0,77	27,0±1,83	7,01±0,24	1,09±0,05
	♀	52,0±2,25	11,8±0,47	26,7±1,25	6,6±0,19	1,07±0,06
1 год	♂	57,0±2,6	14,4±2,02	23,4±3,23	8,08±0,04	1,07±0,16
	♀	52,0±1,54	15,2±0,67	17,0±1,31	7,96±0,47	1,14±0,07
2 года и старше	♂	50,0±5,05	14,4±0,40	14,5±2,53	6,70±0,10	1,29±0,01
	♀	46,0±1,55	13,8±0,69	17,4±1,61	6,50±0,52	1,29±0,12




Стадо мини-свиней состоит из селекционной и пользовательской групп СМС разных возрастов. Основное направление работы в селекционной группе – выведение стандартных лабораторных животных с небольшой живой массой. Пользовательская группа предназначена для проведения медико-биологических экспериментов в основном на базе вивария лаборатории биомедицины нашего Центра [3].

Фармакокинетика и токсикология. Фармакокинетические исследования легко проводятся на мини-свиньях с повторяющимся забором образцов крови или образцов других видов жидкостей из тела или тканей. Цитохром Р-450 – метаболический фермент печени – был широко изучен и сравнен с цитохромом человека. Описание сходства и различия *CYP* у человека и разных животных дано в главе 3.

Использование мини-свиней в тестах общей токсикологии с использованием продолжающейся внутривенной инфузии, процедурах на коже или ингаляциях широко описаны в литературе. Основополагающие данные по токсикологическим исследованиям (офтальмология, клиническая патология, ЭКГ, вес органов, гистопатология и параметры репродукции) хорошо представлены в исследованиях и могут быть интерпретированы. Данные по гистопатологии и токсикопатологии в результате спонтанных или вызванных лекарствами причин являются доступными в научной литературе [3, 4, 27, 28, 51].





Администрирование доз и техника взятия проб – это оральные процедуры с использованием желудочного зонда или дозировки диеты с добавлением медикаментов в корм. Дозирование с помощью желудочного зонда у конвенциональных животных может вызвать стресс у животных.

NB! Ввиду анатомических и физиологических сходств кожи человека и мини-свиньи, последние весьма полезны для дерматологии, косметологии, фармакологии и токсикологии.

Эта процедура используется в токсикологических исследованиях кожи для острой токсичности и в процедуре повторяющихся доз, исследованиях дермальной абсорбции, фототоксичности и фоточувствительности. Парентеральные дозы могут быть применены в виде инъекций внутримышечно, подкожно, внутрикожно и внутривенно. Последнее может быть выполнено или с помощью введения большого количества жидкости (болюсов), или как продолжающиеся внутривенные инфузии. На мини-свиньях были успешно применены также закапывания лекарственных средств в носовые ходы и в виде ингаляций [3, 5].





Наблюдения, требуемые в тестах на токсичность, такие, как клинические симптомы, вес тела, офтальмоскопия и электрокардиография, являются рутинными процедурами в тестах на токсичность, проводимых на мини-свиньях. Кроме того, гематологический контроль и контроль за биохимическими показателями, параметры иммунотоксичности и техника взятия крови у мини-свиней детально описаны [3, 51].

Процедуры мониторинга здоровья включают гастроинтестинальный тракт, тимус, щитовидную и паращитовидную железы. Слепая кишка мини-свиней такая же большая, как и толстая кишка, которая имеет форму спирали. Тимус размещен в цервикальной области и небольшой своей частью в грудной области. Щитовидная железа размещена в вентральной части трахеи и обе доли объединены в один орган. Паращитовидная железа не прикреплена к щитовидной железе, а в 90% случаев размещена в краниальной части тимуса, что требует хороших навыков для того, чтобы найти обе доли.

Светлогорские мини-свиньи свободны от бактериальных инфекций или вирусных болезней и свободны от любых паразитарных болезней. Гистопатология находит спонтанные возбудители в нескольких случаях, но обычно локально и умеренно [3]. Ранее наиболее свежие и широкие находки контрольных данных были уже опубликованы [5]. Найдено четыре главных спонтанных проявления: (1) артериит (рассеянный, местный, некротичный или фибриноидный), (2) тубулярная атрофия или гипоплазия в яичках (местно), (3) серозная атрофия (клетки костного мозга, главным образом в бедренной или большеберцовой кости) и (4) геморрагический синдром. Этиология всех четырех проявлений





неизвестна. Тромбоцитопения распространена при геморрагическом синдроме и, вероятно, связана с иммунокомплексом, сформированным условиями и отмеченным дегенеративными или регенеративными мегакариоцитичными изменениями.

Репродуктивная токсикология. Как известно, в тестах на репродуктивную токсичность обычно используют два вида животных: *грызунов* и *не-грызунов*. Обычно это крысы и кролики. Мини-свиньи могут быть альтернативным видом в тератогенетических и репродуктивных исследованиях, когда традиционные виды, такие, как мыши, крысы, кролики, являются неподходящими. Нечеловекообразные обезьяны имеют ограничения по количеству и сохранности главным образом из-за того, что они приносят только одного детеныша.

NB! Мини-свиньи СМС соответствуют SPF-стандартам, относительно недороги и имеют большое количество сходных черт с человеком.

Репродуктивные характеристики светлогорских мини-свиней были описаны совместно с протоколом тератогенетических тестов и записями контрольных данных. Протокол тестирования может быть кратко описан следующим образом. Половой зрелости светлогорские мини-свиньи достигают в 6-месячном возрасте. Обычно самый хороший возраст для включения в эксперимент 5-10 месяцев. Тератогенетические исследования длятся от начала имплантации (день 11-й) до закрытия жесткого нёба (день 35-й), включая беременность.




Могут быть использованы различные процедуры наблюдения. Наиболее широко применяют оральные процедуры, но может быть также применена процедура продолжающихся внутривенных вливаний. Беременность может контролироваться ультрасонографией на 4-5-й неделе беременности. Свиней забивают на 110-112-й день беременности. Так как вес плода составляет 350-400 г, можно провести полную аутопсию эмбрионов. Обычно протокол включает эмбриональные исследования после изъятия из матки и окраски скелета. Для изучения скелета можно добавить рентген, так как кости скелета и плотность костей лучше визуализируются, чем при окрашивании ализарином. Сетлогорские мини-свиньи весьма подвержены тератогенетическим эффектам третиноина с пороками развития, похожими на тератогенетический эффект ретиноловой кислоты у людей.

Светлогорские мини-свиньи полезны как модель изучения эффектов мужского оплодотворения. Показано, что самцы мини-свиней более подвержены химическим воздействиям с побочными (вредными) эффектами на способность оплодотворения, чем самцы крыс. Мини-свиньи имеют большее *сходство с человеком* в норме оплодотворения, проценте морфологически ненормальной спермы, проценте спермы со способностью к движению и вероятностью крипторхизма.

Ювенильные исследования были введены в доклинические программы, по той причине, что некоторые лекарства являются проблемными для детей без проверки безопасности их использования в аналогичной возрастной группе. Стандарт доклинических исследований должен включать профиль безопасности для всех педиатрических групп, особенно в реакциях развивающегося мозга, дыхательной системы, почек, репродуктивной и иммунной систем. В США и Евросоюзе это послужило мотивировкой для разработки руководства по доклиническим исследованиям на ювенильных животных для фармацевтики педиатрических показателей. Традиционно, *крысы* и *собаки*, но не свиньи, являлись видами, выбираемыми для исследований.

Оценка годности мини-свиней для такого рода исследований была проведена учеными разных стран. Протоколы проведения ювенильных исследований включают подсадку всех животных к одной матери для того, чтобы избежать эффекта случайности. Подсадка молодняка мини-свиней для подготовки ювенильных токсикологических исследований является важной практикой подготовки для последующего содержания в лаборатории тестирования. На ювенильных мини-свиньях проводят такие исследования, как оральное или парентеральное дозирование, офтальмоскопия, ЭКГ и повторяющийся забор проб крови для клинической патологии и токсикокинетики. Имплантация венозных портов для ежедневной внутривенной дозировки была удачной, начиная с 7-го дня и далее. Клинико-патологические данные очень важны, так как многие стандартные параметры изменяются с возрастом.




Правовые вопросы и биоэтика. Свиньи и мини-свиньи как модель в тестах на токсичность фармацевтических и других химических веществ в настоящее время приняты в Японии, ЕС и США. Свиньи и мини-свиньи особенно упоминаются как потенциальный вид *не-грызунов* в руководствах Японии и Канады. Свиньи и мини-свиньи внесены в руководство OECD 409 (OECD – Organization for Economic Cooperation and Development – Организация экономического сотрудничества и развития) [51]. Однако еще требуется стандартизовать имеющийся в наличии вид *светлогорских мини-свиней* для исследований в России и зафиксировать это в соответствующих документах Росздравнадзора [3, 9].

NB! Мини-свиньи являются полезным видом не-грызунов в исследовании безопасности лекарств. Однако отбор наиболее подходящих моделей-животных должен быть комплексным.

Многие фармацевтические предприятия содержат собак и исходят от них при своих оценках токсичности. Мини-свиньи могут быть коммерчески менее подходящими животными, в основном из-за живого веса, так как они требуют большего количества кормов.



Качество мини-свиней обычно высокое, но их содержание требует закрытой барьерной системы. Светлогорская линия выращивается в надлежащих условиях, которые дают в результате хороший иммунологический статус. Реальной отдачей для фармакологии и токсикологии является то, что выбор мини-свиней для оценки лекарств имеет биоэтические, аллометрические, таксономические и экстраполяционные преимущества.

Стандартизованные модели токсичности

Программа OECD обеспечивает механизм развития новых или обновления существующих *Руководств по использованию тестов TG* (*Test Guideline*). OECD TG широко используется мировым научным сообществом и признано авторитетами в странах-членах OECD и не-членах OECD. Совместное совещание Химического комитета с Рабочей группой по химикатам, пестицидам и биотехнологии, выработало политику по дальнейшему улучшению *TG*.




Разработанные новые методы проходят процедуру включения в *Руководство по использованию тестов*. Описание метода подается в Рабочую группу, которая рассматривает метод с точки зрения его целей, технического содержания, этических принципов при использовании животных, стоимости, соответствия национальным политическим требованиям. Затем Рабочая группа выносит метод на Общее обсуждение, которое проводится в среднем 1 раз в 8 месяцев. Вынесенное решение возвращается в Рабочую группу. При необходимости метод дорабатывается и вновь выносится на Общее обсуждение. Общее время, необходимое на внесение нового метода в *Руководство*, существенно варьирует, но в среднем оно занимает примерно 18 месяцев.

Метод определения класса острой токсичности *TG 423* аналогичен по выбору животных, целям и условиям выполнения методу TG 420 и состоит из последовательной процедуры с использованием трех животных одного пола (обычно самок) на каждом шаге. Отсутствие или наличие летальных исходов от определенной дозы вещества определяет следующий шаг, при котором дальнейшее тестирование больше не нужно, а необходимы три дополнительных особи для тестирования с той же самой дозой или по три дополнительных особи для тестирования с более высокой или более низкой дозы. Стартовая доза выбирается из четырех фиксированных уровней в 5, 50, 300 или 2000 мг/кг. Конечной дозой является та, которая с наибольшей вероятностью приведет к летальному исходу у некоторых из тестируемых животных. В случаях, когда такой информации нет, стартовая доза принимается равной *300 мг/кг*.

Таблица 4.3

Процедуры TG для краткосрочных и долгосрочных токсикологических тестов (по данным OECD Guidelines for the Testing of Chemicals)




TG	Наименование документа и комментарий
401	Острая пероральная токсичность (исключен). Принят 12.05.1981. Дата временного исключения: 20.12.2002 г.
402 ТнЖ	Острая дермальная токсичность. Принят 12.05.1981. Подтвержден 24 февраля 1987 г.: учтено требование уменьшения количества животных и отказа от животных в эксперименте, по сравнению с оригинальным методом снижения уровня используемых доз.
403 ТнЖ	Острая ингаляционная токсичность. Принят 12.05.1981.
404 ТнЖ	Острое раздражение и коррозия кожи. Принят 12.05.1981. Подтвержден 24.04.2002 как стратегия уменьшения количества животных и отказа от использования животных в соответствии с требованиями OECD TG, включая тесты *in vitro*.
405 ТнЖ	Острое раздражение и коррозия глаз. Принят 12.05.1981. Подтвержден 24.04.2002 как стратегия уменьшения количества животных и отказа от использования животных в соответствии с требованиями OECD TG, включая тесты *in vitro*.
406 ТнЖ	Чувствительность кожи. Принят 12.05.1981. Подтвержден 17.07.2002 как стратегия уменьшения количества животных в экспериментах до 50% по сравнению с оригинальным OECD TG.
407 ТнЖ	Изучение пероральной токсичности у грызунов в повторяющихся дозах в течение 28 дней. Принят 12.05.1981. Подтвержден 27.07.2002 как стратегия отказа от использования животных в экспериментах по сравнению с оригинальным OECD TG, больше информации о практике дозировки, больше информации о таких же животных.
408 ТнЖ	Изучение пероральной токсичности у грызунов в течение 90 дней. Принят 12.05.1981. Подтвержден 21.09.1998.
409 ТнЖ	Изучение пероральной токсичности у не-грызунов в течение 90 дней. Принят 12.05.1981. Подтвержден 21.09.1998.
410 ТнЖ	Дермальная токсичность. Принят 12.05.1981.
411 ТнЖ	Субхроническая дермальная токсичность в течение 90 дней. Принят 12.05.1981.
412 ТнЖ	Ингаляционная токсичность. Тест повторяющихся доз в течение 14/28 дней. Принят 12.05.1981.
413 ТнЖ	Субхроническая ингаляционная токсичность в течение 90 дней. Принят 12.05.1981.
414 ТнЖ	Изучение развития пренатальной токсичности. Принят 12.05.1981. Подтвержден 22.01.2001, количество используемых животных снижено до 20% по сравнению с оригинальным OECD TG; метод дает больше информации об аналогичных животных.





Таблица 4.3 (*продолжение*)

TG	Наименование документа и комментарий
415 ТнЖ	Изучение первого поколения репродукционной токсичности. Принят 12.05.1983.
416 ТнЖ	Изучение второго поколения репродукционной токсичности. Принят 26.05.1983. Подтвержден 22.01.2001.
417 ТнЖ	Токсикокинетика. Принят 04.04.1984. Подтвержден 17.07.1995.
418 ТнЖ	Задержка нейротоксичности фосфорорганических субстанций, следующих за острыми проявлениями. Принят 04.04.1984. Подтвержден 27.07.1995.
419 ТнЖ	Изучение задержки нейротоксичности фосфорорганических субстанций в повторяющихся дозах в течение 28 дней. Принят 04.04.1984. Подтвержден 27.07.1995.
420 ТнЖ	Острая пероральная токсичность – процедура фиксированной дозы. Принят 17.07.1992. Подтвержден 17.12.2001. Использован метод снижения количества используемых животных или полного отказа от них по сравнению с условиями метода TG 401, меньше страданий, меньшее количество животных в эксперименте.
421 ТнЖ	Тест скрининга репродукционной и развивающейся токсичности. Принят 27.07.1995. Метод снижает использование животных в эксперименте по сравнению с оригинальными TG, обеспечивая необходимую информацию с минимальным количеством животных.
422 ТнЖ	Комбинированное изучение токсичности в повторяющихся дозах с тестом скрининга репродукционной и развивающейся токсичности. Принят 22.03.1996. Метод снижает использование животных в эксперименте по сравнению с оригинальными TG, комбинирует новые скрининговые тесты на репродукционную токсичность с TG 407 и еще больше снижает количество животных до абсолютного минимума при комбинации точек окончания эксперимента.
423 ТнЖ	Острая пероральная токсичность. Класс методов острой токсичности (АТС). Принят 22.03.1996. Подтвержден 17.12.2001. Метод снижает количество животных по сравнению с условиями TG 401, используя значительно меньше животных (10% от требующихся в TG 401).
424 ТнЖ	Изучение нейротоксичности у грызунов. Принят 21.07.1997.
425 ТнЖ	Острая пероральная токсичность. Процедура «вверх-и-вниз». Принят 21.09.1998. Подтвержден 17.12.2001. Тест снижает количество животных по сравнению с условиями TG 401, требуется меньше животных, обеспечивающих точность оценки LD_{50} как в методах TG 420 и 423.
426 ТнЖ	Изучение развития нейротоксичности. Планируется в новом руководстве.
427 ТнЖ	Впитывание кожей: метод *in vivo*. Принят 13.04.2004.






Таблица 4.3 (*окончание*)

TG	Наименование документа и комментарий
428	Впитывание кожей. Метод *in vitro*. Принят 13.04.2004. Хорошая альтернатива методу *in vivo*, для полной замены метода TG 427.
429 ТнЖ	Чувствительность кожи. Исследование местных лимфатических узлов. Принят 24.04.2002. По сравнению с TG 406, позволяет уменьшить количество используемых животных или вовсе отказаться от них, более информативен, доставляет меньше страданий животным.
430	Коррозия кожи *in vitro*. Тест транскожной электрической устойчивости. Принят 13.04.2004. Альтернативный тест, используется как метод замены животных в испытании на разъедание кожи по TG 404.
431	Коррозия кожи *in vitro*. Модель теста на коже человека. Принят 13.04.2004. Альтернативный тест, используется как метод замены животных в испытании на разъедание кожи по TG 404.
432	Тест фототоксичности *in vitro* 3T3. Принят 13.04.2004. Альтернативный тест. Полная замена, поскольку нет аналогичных тестов OECD TG на животных.
433 ТнЖ	Острая токсичность ингаляций. Процедура фиксированной дозы (FDP). Планируется в новом руководстве. По сравнению с TG 403, позволяет уменьшить количество используемых животных или вовсе отказаться от них, доставляет меньше страданий животным.
434 ТнЖ	Острая дермальная токсичность. Процедура фиксированной дозы (FDP). Планируется в новом руководстве. По сравнению с TG 404, позволяет уменьшить количество используемых животных или вовсе отказаться от них, доставляет меньше страданий животным.
435 ТнЖ	Коррозия кожи *in vitro*. Планируется в новом руководстве. По сравнению с TG 404, позволяет уменьшить количество используемых животных или вовсе отказаться от них. Используется для специфических целей, только для изучения кислот и оснований.
436 ТнЖ	Острая токсичность ингаляций. Класс токсичности (АТС). Планируется в новом руководстве. По сравнению с TG 403, позволяет уменьшить количество используемых животных или вовсе отказаться от них, доставляет меньше страданий животным.
451 ТнЖ	Изучение канцерогенности. Принят 12.05.1981.
452 ТнЖ	Изучение хронической токсичности. Принят 12.05.1981.
453 ТнЖ	Комбинированное изучение хронической токсичности и канцерогенности. Принят 12.05.1981 как комбинирование исследований в тесте TG 453 двух предыдущих, что может снижать количество животных по сравнению с использованием только в TG 451 и TG 452.




OECD – Organization for Economic Cooperation and Development (Организация по экономической кооперации и развитию)
ТнЖ – тест на животных. Директива 86/609/EEC определяет животных как любое живое нечеловекообразное позвоночное.



Процедура «вверх-и-вниз» *TG 425* аналогична целям и условиям TG 420, но содержит прогрессию из одинарных доз, которые проверяются преимущественно на самках крыс в одно и то же время. Первое животное получает дозу на шаг ниже уровня LD_{50}, а если информация по предварительной оценке отсутствует, то стартовая доза берется равной *175 мг/кг*. Если животное выживает, то доза следующего животного увеличивается в 3,2 раза от первоначальной дозы; если умирает, то доза следующего животного уменьшается в соответствующей прогрессии [38].

Оценка острой токсичности ингаляций *TG 403* дает информацию о возможности возрастания токсических эффектов при кратковременных аэрозольных воздействиях. Этот тест является основой для классификации и маркировки по параметрам средней летальной концентрации LC_{50}, полученных в острых экспериментах. Опыты проводят в течение определенного времени для тестирования субстанции, по меньшей мере, в трех заданных концентрациях. Несколько групп крыс по 10 особей (5 самцов и 5 самок) используются для оценки минимум трех заданных концентраций, по одной концентрации на одну группу. Усло-




вия эксперимента должны предусматривать содержание не менее19% кислорода, стабильное атмосферное давление и 12–15-кратный воздухообмен в час. Животных наблюдают ежедневно в течение 14 дней. Особое внимание уделяется изменениям глазных и слизистых оболочек, дыхательной, кровеносной систем, кожи и меха. Остальные процедуры выполняются в соответствии с тестом TG 420.

В соответствии с соглашением между странами-членами OECD в июне 2004 г. предложена *процедура фиксированной дозы* TG 433 как альтернатива оценки острой ингаляционной токсичности по методу TG 403. Различие между TG 403 и новым тестом TG 433fd заключается в том, что процедура фиксированной дозы применяется позже со стратегией, аналогичной используемой в TG 420. В комбинации с использованием появления симптомов отравления как точки окончания тестирования вместо летального исхода были достигнуты значительные улучшения, касающиеся минимизации страданий животных и уменьшения использования лабораторных животных в эксперименте.

NB! В токсикологических исследованиях комплексная оценка химических рисков основывается на предположении, что эффект, наблюдаемый на лабораторных животных, будет наблюдаться и у человека.

Касаясь достоверности и корректности методов оценки острой токсичности, следует отметить, что субстанции, использование которых может привести к задержке летального исхода, должны быть исследованы

по методике TG 425, в которой продолжительность тестирования будет существенно длиннее по сравнению с другими методами тестирования. Внутри методов TG 420 и TG 423, нахождение периода задержки летального исхода может потребовать дополнительно более низких уровней доз для практического использования или повторения исследований.

Сравнительный статистический анализ показал, что при всех трех методах корректность результатов исследования зависит от выбора уровня стартовой дозы по значениям $LD_{50.}$ Поскольку TG 420 вместо летального исхода использует развитие отравления как *точку окончания эксперимента*, он не может быть принят в качестве достоверной информация о токсическом эффекте, близком к летальным дозам [59]. Только использование всех трех тестов повысит уровень надежности полученных результатов.

Этические нормы и концепции защиты животных, выдвигаемые в последние 20 лет, как и текущие изменения в регулировании охраны окружающей среды, делают очевидным необходимость поиска новых подходов. Очевидно, что необходима замена тестов на животных для оценки безопасности химических средств и продуктов на альтернативные. Но где же их пока взять?




Новые модели в токсикогеномике и канцерогенезе

Необходимость или, что вернее, желание достижения полной замены животных в тестах моделями систем в области токсикокинетики, метаболизма и зародившейся области токсикогеномики предполагает расшифровку механизмов генотоксичности и мутагенеза, которые должны помочь в развитии подходящих моделей *in vitro*. Прогресс будет зависеть от ряда факторов, таких, как развитие тестов *in vitro* в области токсикокинетики и метаболизма, развитие тестов *in vitro* для исследований годности лекарств, дальнейший прогресс в области токсикогеномики. Гибкий подход к тестам *in vivo*, уже сегодня может способствовать снижению количества используемых в тестах животных [18].

NB! Хотя некоторые тесты *in vitro* поддержаны в настоящее время в качестве допустимых для оценки генотоксичности и мутагенеза при воздействии химическими веществами, они имеют ряд ограничений, таких, как недостаточная способность быть похожими на метаболизм человека, токсикокинетику, суперчувствительность относительно ситуаций *in vivo* [42].

Использование линий клеток далеко не всегда соответствует изучаемым *целевым органам*. По этим причинам разрабатывается новая стратегия тестирования, состоящая из четырех стадий. *На стадии 1*



оценивается изучаемая субстанция на основе существующих данных и знаний, главным образом на основе существующей информации об изучаемых токсикантах и химических веществах. На *стадии 2* проводится батарея тестов *in vitro* для определения рисков. *Стадия 3* включает моделирование цели системы *in vitro*, но моделирование проводится в тех ситуациях, когда один или большее число тестов на *стадии 2* дали положительный результат. *Стадия 4* включает тесты на животных, когда один или большее число тестов на *стадии 3* дали положительный результат. *Стадия 2* включает в себя тесты, разрешенные для проведения в регуляторных целях (см. ниже TG 471; TG 480; TG 476; TG 473), и/или оптимизированные тесты *in vitro*. *Стадия 3* должна включать модели целевых органов/систем *in vitro*, которые необходимо развивать и валидировать (эксперты рекомендуют использовать клетки кожи или модели первой стадии исследований для тестирования косметических продуктов. Окончательно *стадия 4* проводится только в тех случаях, когда это необходимо, но тогда она включает в себя тесты *in vivo*.



NB! С 2005 г. осуществляется международный интегрированный проект развития стратегий тестирования *in vitro* для оценки системной острой токсичности препаратов у человека, которые могли бы полностью заменить тесты определения острой токсичности на животных, применяемых в настоящее время с целью систематизации.



Проект включает сбор, оценку и разработку данных *in vitro* и *in vivo* для сравнительного анализа; определения таких параметров, как кинетика, метаболизм и токсичность для органов. Целью проекта является установление корреляции между изменениями концентраций веществ *in vitro* и дозами токсичности *in vivo*; описание новых инструментов и клеточных систем для определения диапазона эксперимента, стратегий для предварительного определения и имитационного моделирования острой токсичности у животных и человека[20].

Таблица 4.4

Рекомендации OECD TG для токсикогеномных тестов [E]

TG	Наименование и комментарий
471	Тест на профиль бактериальных мутаций. Принят 26.05.1983. Подтвержден 21.07.1997. Тест *in vitro* для точек мутаций*. Альтернативный тест как часть общей стратегии тестирования.
472	Токсикогеномика. *Escherichia coli*. Исследование не было валидировано. Принят 26.05.1983. Дата исключения 21.07.1997, метод поглощен TG 471.
473	Тест аберрации хромосом млекопитающих *in vitro*. Принят 26.05.1983. Подтвержден 21.07.1997. Альтернативный тест, часть батареи тестов; он не полностью замещает тесты *in vivo*.

Таблица 4.4 (*окончание*)

TG	Наименование и комментарий
474 ТнЖ	Тест микронуклеусов эритроцитов млекопитающих. Принят 26.05.1983. Подтвержден 21.07.1997. Снижено количество животных по сравнению с версией 1983 г., используется меньше животных.
475 ТнЖ	Тест аберрации хромосом костного мозга млекопитающих. Принят 26.05.1983. Подтвержден 21.07.1997.
476 ТнЖ	Тест мутации генов клеток млекопитающих *in vitro*. Принят 04.04.1984. Подтвержден 21.07.1997.
477	Токсикогеномика. Тест на летальность рецессивного гена пола у *Drosophilia melanogaster*. Принят 04.04.1984. Альтернативный тест, так как мухи являются беспозвоночными.
478 ТнЖ	Токсикогеномика. Тест на летальность доминант грызунов. Принят 04.04.1984.
479	Токсикогеномика. Исследование *in vitro* сестринских хроматоидных изменений в клетках млекопитающих. Принят 23.10.1986. Тест *in vitro* изменений ДНК между сестринскими хроматидами, определение генетической токсичности*. Альтернативный тест, является частью общей стратегии тестирования.
480	Генетическая токсикология. *Saccharomyces cerevisiae*. Исследование генной мутации. Принят 23.10.1986. Тест in vitro генной мутации *Saccharomyces**. Альтернативный тест является частью стратегии тестирования.
481	Токсикогеномика. *Saccharomyces cerevisiae*. Исследование митотических рекомбинаций. Принят 23.10.1986. Тест на генотоксичность *in vitro* митотических рекомбинаций у *Saccharomyces**. Альтернативный тест является частью общей стратегии тестирования.
482	Токсикогеномика. Повреждение и исправление ДНК, неописанный синтез ДНК в клетках млекопитающих *in vitro*. Принят 23.10.1986. Альтернативный тест, является частью батареи тестов, не полностью заменяет тест *in vivo*.
483 ТнЖ	Тест сперматогониальной аберрации хромосом млекопитающих. Принят 23.10.1986. Подтвержден 21.07.1997.
484 ТнЖ	Токсикогеномика. Тест мышиного пятна. Принят 23.10.1986.
485 ТнЖ	Токсикогеномика. Тест наследования транслокации у мышей. Принят 23.10.1986.
486 ТнЖ	Тест неописанного синтеза ДНК на клетках печени млекопитающих in vivo. Принят 21.07.1997.
487	Тест микронуклеусов *in vitro*. Планируется в новом руководстве. Альтернативный тест, является частью батареи тестов; не полностью заменяет тест *in vivo*.




* Все тесты i*n vivo* генетической токсикологии являются частью стратегии тестирования, которая проводится на животных только в случае необходимости (в случае получения двусмысленных результатов на альтернативных моделях).
ТнЖ – тест на животных. Директива 86/609/EEC определяет животных как любое живое нечеловекообразное позвоночное.





Альтернативные модели гено- и эмбриотоксичности

Специальным соглашением по использованию тестов *in vitro* для оценки генотоксичности в перечень исследовательских методов были включены тесты *Ames* бактериальной противоположной мутации, как и тесты *in vitro* для хромосомной аберрации, мутации генов клеток и изменений в сестринских хроматидах (OECD TG 471, 473, 476 и 479, соответственно [11, 34]. Использование этих приемов, самих по себе или в комбинации, дает высокочувствительные тесты определения генетической токсичности [39, 41]. Научные и этические соглашения по использованию методов *in vitro* для нахождения точки окончания эксперимента, тесты на определение генетической токсичности *in vivo* послужили отправным моментом для *валидации* [35].

В соответствии с рекомендациями Агентства по защите окружающей среды США (EPA – Environmental Protection Agency) были предложены тесты по оценке острой токсичности на рыбах, икре рыб, *in silico*. ECVAM *валидировала* использование эмбриональных стволовых клеток для эмбриотоксичности, а также использования культуральных клеток животных и человека.




Тесты на рыбах. В настоящее время EPA продолжает использовать тесты *in vitro* для оценки острой токсичности у рыб [35] Одна из альтернатив была описана в TETRATOX, в которой используется *Tetrahymena* как биологический маркер в оценке экологического риска загрязнения воды. Биохимия и физиология *Tetrahymena* были изучены еще в 1950-х годах, и *Tetrahymena*, и особенно *T.pyriformis*, широко используются с 1970-х годов для определения токсичности в тестах воды. Более того, геномы организмов хорошо изучены. Популяция *T.pyriformis* растет быстро, инэкстенсивно и широко. Данные, полученные в TETRATOX, демонстрируют высокую степень соответствия данным, полученным в исследованиях рыб. В последние годы интенсивно развиваются исследования на рыбах *Danio rerio* и теляпиях, в том числе для оценки токсичности лекарств и ксенобиотиков.

Другое обещающее исследование *in vitro* – исследование икры рыб [32, 45], которое показывает очень ранние стадии развития эмбриона при концентрациях изучаемой субстанции. Этот тест используется в настоящее время в Германии как замещающий рыб тест при оценке загрязнения воды и может быть признан замещающим тестом во всех случаях использования рыб в тестах на острую токсичность лекарств, ксенобиотиков и токсикантов.

Кроме того, тест ECOSAR (ecological structure-activity relationships), в моделях *in silico* при определении химической токсичности для орга-

низмов, живущих в воде, рекомендован к использованию в программе HPV руководством EPA [54]. Модель дает возможность предсказать эффекты ряда таксономических групп, включая рыб, беспозвоночных и водоросли, при изучении как острой, так и хронической токсичности лекарственных средств [39, 57].

***Тест эмбриональных стволовых клеток* (*EST*)**, валидированный ECVAM как тест для выявления эмбриотоксичности, определяет критические параметры и наличие развивающейся токсичности [19]. Тест использует стволовые клетки крыс, которые помещены в культуру и обладают способностью к дифференцированию. Эмбриотоксичность определяется по концентрации тестируемых химических веществ, необходимых для подавления 50% дифференциации, вместе с ростом ингибиции на 50% относительно контроля. Этот валидированный тест идеально подходит для немедленного использования как меры уменьшения на основном, скрининговом уровне программы типа EPA's HPV Challenge [54], где химические вещества, которые получили положительную оценку в тесте на эмбриотоксичность, должны быть классифицированы как вероятно развивающие токсичность, без продолжения тестирования другими методами. Несмотря на то, что метод признан снижающим использование животных в виду его высокого потенциала, который может спасти жизнь более чем 30% животных, используемым в обычных пренатальных определениях развивающейся токсичности, в соответствии с OECD 414 [41] – EPA и другие участвующие компании пока отказались использовать этот тест в программе HPV.




Клеточные линии человека и животных. Предлагаются методы оценки острой системной токсичности *in vitro*, включающие два основных метода определения цитотоксичности, с использованием обычных кератиноцитов человека *NHK* и клеточных линий фибробластов мышей *BALB/c 3T3.* Эти тесты являются наиболее подходящими для немедленного использования как снижающая мера для вычисления стартовой дозы in vivo [29, 58]. Предполагается [50], что вследствие этого возможно снижение использования животных на 40%. EPA также рекомендует участникам программы [55] включать данный метод в программы определения острой токсичности. Тем не менее, исследователи часто игнорируют рекомендованные методы определения острой цитотоксичности методами *in vitro*, когда в тестах используются нетоксичные материалы и вещества [56], предпочитая животных-моделей.



Альтернативные батареи тестов

Одной из основных проблем альтернативного моделирования является выбор правильной стратегии тестирования для новых химических веществ и инновационных лекарств, по которым еще нет данных о потенциальной токсичности их молекул. Только некоторые исследования вносят новые данные в проблему поиска и валидации общепринятых методов. Исследования *in vitro* позволят сформировать общую стратегию тестирования. Для этого необходима новая техника использования культур клеток, которая обеспечит уровень функционирования системы или органа в целом, что позволит вычленить в *in vitro*-моделях функциональные свойства *in vivo*-органа в целостном организме. Общепринятым подходом является использование нескольких параллельных исследований на клеточных культурах, которые условились обозначать как батарею тестов.





NB! Батарея тестов (test battery) представляет собой мультиметодическое использование серии тестов, проводимых обычно в одно и то же время или в тесной связи друг с другом. Каждый тест внутри последовательности строится для получения дополнительной информации от предыдущего и для измерения различий дополнительного многофакторного токсического эффекта.

Максимально толерантная доза *in vitro* устанавливается на основе определения минимальной концентрации лекарств *in vitro*, которая приводит к изменениям в клеточной морфологии. Лактатдегидрогеназа (LDH) уменьшает или повышает до 50% смертность клеток (CT_{50}), что предполагает соответствие этой дозы лекарств дозе *in vivo*. Она дает повышение до первоначальных или слабых проявлений токсичности, то есть до тех пор, пока минимальная концентрация лекарств *in vitro* не приведет к гибели более 90% клеток (CT_{100}) и не будет соответствовать дозе *in vivo*, которая в свою очередь дает повышение маркированных клинических показателей. Значения CT_{50} и CT_{100} (мг/мл) трансформируются в мг/кг/день для порога *in vivo* [23].

Следует подчеркнуть, что первичные культуры гепатоцитов крысы более чувствительны, чем многие другие типы клеток. Они используются для прогнозирования значений *in vivo* у собак. Клетки MDBK (почки крупного рогатого скота, телят) менее чувствительны и используются для получения прогнозируемых данных *in vivo* у крыс. Клетки McCoy эпителия человека служат в качестве контроля *in vitro*. Такие параметры роста и морфологии, как площадь поверхности, занятая растущими линиями клеток, изменения в размерах и форме клеток, наличие цитоплазматических вакуолей, деление клеток, гибель и умирающие

клетки, учитываются после экспозиции: для гепатоцитов – 24 часа, для остальных клеточных линий – 24, 48 и 72 часа. Ниже мы приводим некоторые, наиболее распространенные, батареи тестов для *альтернативного моделирования* острой токсичности [34, 47, 48].

Тест* А *Hep G2 cell/protein content основан на использовании линии клеток гепатомы для тестирования субстанций. Цитотоксичность измеряется как изменение содержания белка по методу, описанному Lowry и др. [31]. Тест принят для использования в батарее тестов совместно с тестами **B-D** или в комбинации только с тестом **B**, для уменьшения количества животных в опытах по изучению острой токсичности при применении препаратов *per os* [54].

NB! Статус валидации оценен в Multicentre Evaluation of *in vitro* Cytotoxicity (MEIC – многопрофильный центр по оценке цитотоксичности *in vitro*) по *релевалентности цитотоксичности* тестов *in vitro* для оценки острой токсичности у человека.




Результаты MEIC показали соответствие тестов, проведенных на клеточных культурах человека для определения базальной цитотоксичности. В батарею тестов, для улучшения общих результатов моделирования, должны быть включены два вида тестов: тесты *in vitro*, имеющие соответствие по токсикокинетике, и тесты *in vitro*, целью которых является определение токсичности для органов. Тесты были разработаны для оценки летальных концентраций в крови человека и их, в противовес концентрации в крови *in vivo*, необходимо комбинировать с данными по поглощению в соответствии с предполагаемыми проверяемыми дозами. Тест осуществляется в течение 24 часов [54, 57, 60].

Тест* В *HL-60/АТФ content основан на использовании указанных клеток острой миелолейкемии человека для тестирования субстанций. Содержание АТФ измеряют с помощью Lucifer-LU плюс оборудование для биолюминесценции из энзимной люцеферин-люцеферазной реакции [19]. Тест принят для использования в батарее тестов совместно с тестами **A**, **C** и **D** (см. ниже) или в комбинации только с тестом **A**. Тест разработан и оценен по программе MEIC для определения летальной концентрации в крови человека. Результаты, в противовес концентрациям в крови, должны быть рассмотрены в комбинации с данными по абсорбции в соответствии с прогнозированием управляемых доз. Тест осуществляется в течение 24 часов [57].

Тест* С *Chang liver cell основан на использовании клеток печени Chang'а, культивированных в запечатанных парафином чашках с 96 ячейками для микротитрования. Недостаток развития веретенообразных или веретеновидных клеток является критерием цитоингибирования. Культуры затем культивируются в течение 7 дней и используются





в тесте **D**. Оценен по программе MEIC для использования в батареях тестов **A**, **B** и **D**. Тест разработан для оценки летальной концентрации в крови человека. Результаты должны быть рассмотрены, в противовес концентрациям в крови, в комбинации с данными по абсорбции в соответствии с прогнозированием управляемых доз [50, 57].

Тест* D *Chang cell/pH основан на использовании культуры из теста **C**. Через 168 часов цвет pH индикатора фенол красный, включенного в среду, записан. Фиолетовый цвет является показателем *полного ингибирования*, в то время как наличие небольшого количества основного красного, как и не являющегося нормальным оранжевого цвета говорит о *частичном ингибировании*. Используется в батареях тестов **A**, **B** и **C**.

***Тест* E *BALB/c 3T3* (*NRU*)** используется для определения цитотоксичности на изолированных клетках указанной линии мышей для испытания выживания и жизнеспособности, определяемой по способности переживающих клеток окрашиваться нейтральным красным (*NRU*). NR аккумулируется в лизосомах. Изменения поверхности клетки связаны со снижением поглощения и связывания NR. Тест валидирован и широко распространен. Тест является альтернативой

использования животных по определению острой токсичности средств, применяемых *per os* [14, 30].

Тест* F *NRU* на *линии человеческих кератиноцитов используется для определения цитотоксичности на изолированных клетках человека по показателям выживания и жизнеспособности, определяемой по способности переживающих клеток окрашиваться нейтральным красным (*NRU*). NR аккумулируется в лизосомах. Тест валидирован, широко распространен и является альтернативой использования животных по определению острой токсичности средств, применяемых *per os*. Тест осуществляется в течение 48 часов [13, 15, 22, 49].

Моделирование хронической токсичности

Следует сразу подчеркнуть, что на данном этапе развития научных исследований оценка хронической токсичности и ее разновидностей возможна *исключительно с использованием животных*.

Токсикологический и канцерогенный потенциал химических веществ обычно определяют в последовательности экспериментов: *токсичность острую*, *подострую* (14 дней), *субхроническую* (90 дней) и *хроническую* (2 года) – на крысах и мышах обоих полов. В некоторых странах существуют требования проверки хронической токсичности на более крупных животных (кролики, кошки, собаки, мини-свиньи).

NB! Следует отметить, что *подострая* и отчасти *субхроническая* токсичность являются в определенной степени *лукавством* в целях замены или замещения полноценных исследований хронической токсичности. Необходимы четкие рекомендации и регламентации, определяющие эти подтипы хронической токсичности. Пока их нет!

Общепринято, что уровни доз для 14-дневного эксперимента по токсичности обычно оцениваются по данным литературных источников, если такие существуют. Информация о токсичности из 14-дневного эксперимента используется для выбора доз для 90-дневного опыта. Протокол 14-дневного эксперимента включает 5 доз и контрольные группы, по 5 животных в группе каждого пола и вида. Всего используют 120 животных на опыт.

В настоящее время, в дополнение к очистке текущих протоколов тестирования, оцениваются потенциальные методы тестирования *in vitro* для частичного или полного отказа от 14-дневных изучений токсичности, особенно для химических веществ, наносимых на кожу. В исследовании *in vitro* с использованием EpiDerm™ для оценки раздражения кожи используют нейтральный красный NRU, а для оценки системной токсичности используют цитотоксичность на первичных гепатоцитах крыс для оценки гепатотоксичности. Обычно тесты EpiDerm и NRU дают хорошую оценку, соответствующую тестам *in vivo*. Однако необходимо большое количество баз данных для принятия окончательного решения о соответствии результатов *in vitro* результатам *in vivo*.




NB! Модели хронической токсичности *in vivo* – это основы оценки функциональных и морфологических нарушений у экспериментальных животных при применении веществ от 6 до 12-18 мес.

Более полно хроническую токсичность можно определить как *последовательность дисфункций* или прогрессивно ухудшающихся функций клеток, органов или систем множественных органов в результате длительного воздействия химических веществ. Предложены реперные точки эксперимента и разрабатывается интегрированный подход к тестированию, основанный на альтернативных методах при наличии моделей *in vitro*. Определены пять наиболее общих мишеней токсичности для оценки повторяющихся доз: *печень, почки, ЦНС, легкие* и *гематопоэтическая система*.

NB! Подострая и субхроническая токсичность не являются самостоятельными моделями или отдельными видами исследований, а отображают нечто типа «предхронической» токсичности, в оценке безопасности лекарств и иных фармако-токсикологических исследованиях.

Разработанные методы используются сегодня на всех исследовательских уровнях, но ни один не может быть назван не только идеаль-



ным, но хотя бы приемлемым для оценки цели любой токсичности для органов. Необходимо предпринять попытки оптимизировать существующие модели и найти соответствующие модели *in vitro* в тех случаях, когда имеется несколько моделей, например, для легких, печени и так далее. В общем случае рекомендуется провести дополнительное исследование для обеспечения лучшего понимания патогенезиса хронических болезней и места лекарств в их коррекции.

Необходимы дополнительные попытки для оценки NOEL (no observable adverse effect level) – отсутствия у рассмотренных уровней побочных эффектов *in vitro*. Требуется большое число исследований и подтверждений оценок применения подходов моделей QSAR для установления хронической токсичности и для включения их в *батарею тестов* и *стратегию рядов*. Для валидации существующих и вновь разрабатываемых альтернативных моделей понадобится, по-видимому, не менее 10 лет, а достижение *полной замены животных* в регулярных тестах и стратегиях зависит от уровня исследований, адекватной расстановки приоритетов, попыток установления и координации действий ученых разных стран [62].



Токсикокинетика



Фармакокинетика и токсикокинетика описывают кинетические процессы накопления, распределения лекарств и ксенобиотиков, метаболизма и выведения их составляющих из организма. В первом томе [6] мы представили современные взгляды на эти процессы в их классическом, так сказать, выражении.В последние годы предложены принципиально новые подходы, которые основываются на тестировании моделей (*in vitro* и *in silico*). Они включают в себя три ряда, основанные на гибридизированном принципе, и объединяют моделирование на животных и использование альтернативных методов. *Ряд 1* должен оценить *состав компонент*, *ряд 2* должен определить *распределение составляющих* и *ряд 3* должен определить *токсический потенциал* составляющих. Только когда будет получен положительный ответ в *ряду 1*, можно переходить к *ряду 2. Ряд 1* должен включать *батарею тестов* для оценки дермальной, оральной и пульмональной абсорбции.

Необходимо продолжение исследований и попыток развития альтернативных методов, охватывающих процедуру ингаляции, как хорошо проработанную модель интестинального барьера. *Ряд 2* должен включать *батарею тестов* для оценки уровня плазмы, выделения, биоаккумуляции и биотрансформации (метаболизма). Необходимо продолжать

исследования моделей выведения *in vitro* и *in silico* для использования внутри набора тестов, которые необходимо также идентифицировать. Пока не было найдено достаточного количества подходящих тестов для изучения или измерения *биоаккумуляции* составляющих и было рекомендовано продолжение исследований в этой области [58]. Прогресс может быть ограничен развитием стратегий тестов *in vitro* для регуляторного использования. Он будет зависеть от адекватной расстановки приоритетов, попыток установления основных и координационных моментов директивными или государственными органами. Важно, чтобы это основывалось на строгих научных фактах, описывающих процессы живой природы во временных и пространственных рамках.

NB! Пространственно-временная организация живой материи обуславливает периодичность колебания интенсивности процессов, происходящих в организме и составляющих основу хронотоксикологии.

Биоритмика, количественная кинетика и связанные с ними качественные изменения можно наблюдать на молекулярном, субклеточном, клеточном, органном и системном уровнях с помощью методов *хронотоксикологии*. Различают высокочастотные ритмы с продолжительностью периода менее 0,5 ч, среднечастотные, включающие ультрадианные, с продолжительностью периода 0,5-20 ч, циркадианные или циркадные (околосуточные) с периодом 24-48 ч, низкочастотные – циркасептанные (7±3 сут.), циркадигептанные (30±7 сут.) и цирка-аннюальные (1 год±2 мес.) [21].




Так, при изучении биоритмической деятельности эндокринной системы установлена корреляция сезонных изменений в половом поведении животных с сезонными колебаниями секреции тестостерона и эстрадиола. Биоритмы иммунной и эндокринных систем существенно влияют на фармакологические эффекты и особенно на токсичность лекарственных веществ. Биологическим ритмам подвержена секреция альдостерона, АКТГ, глюкокортикоидов, катехоламинов, CYP-ферментов, а также свертывающей системы крови, пищеварительной, нервной и других систем организма.

Эффективность и токсичность противоопухолевых препаратов из группы антиметаболитов (5-фторурацил, цитозинарабинозид) зависят от времени их введения и суточных колебаний цитокинов [28] то есть схема применения препаратов должна быть согласована с ритмами митоза клеток. Установлено, что для возникновения суточного ритма размножения клеток в асцитной опухоли Эрлиха и эпителии пищевода мышей необходимо совпадение во времени расположения в течение суток активных фаз, биоритмов чувствительности клеток к действию кейлонов из этих тканей, обратимо ингибирующих пролиферацию,



и продукции кейлонов этими тканями. Опухолевые клетки меняют чувствительность к цитостатику в определенные часы.

В экспериментах на трансгенных животных получены данные, подтверждающие зависимость развития побочных эффектов при применении кортикостероидов в разное время суток. На генетически измененных мышах было показано, что введение метипреднизолона в позднее время вызывает минимальную потерю массы тела и более слабый тимолитический эффект, чем при введении препарата между 4 и 8 ч утра. Интересно, что максимумы наркотического и токсического эффектов пентобарбитала и галотана находятся в инверсных отношениях, а изменения токсичности нестероидных противовоспалительных препаратов не сопровождается изменениями их терапевтического действия.

Хронозависимость была установлена и при заражении мышей вирусом гриппа. Выживаемость мышей была выше в группе, инфицированной в вечернее время, то есть хронотоксичность имеет большое значение при инфицировании экспериментальных животных и должна учитываться в исследовательской работе, особенно при изучении антимикробных препаратов и вакцин [28].





NB! В токсикокинетических процессах особая роль принадлежит явлениям индукции и репрессии ферментативных реакций, находящихся под генетическим контролем как в макро-, так и в микроорганизмах.

Поскольку многие авторы видят прогресс альтернативного моделирования в использовании клеточных культур и батарей тестов на микроорганизмах, рассмотрим на их примерах роль операторных генов в отношении репрессоров и индукторов (рис. 4.7).

Процессы индукции и репрессии были изучены и выяснены на примере *Escherichia coli*, излюбленного объекта в биотехнологии. В стандартном штамме *E. coli* галактозиды (лактоза) обычно не вступают в метаболизм. Следовательно, в этом микроорганизме отсутствуют ферменты, принимающие участие в метаболизме лактозы (галактозидаза, лактозопермеаза, трансацетилаза). Если в среду добавляется лактоза, то индуцируется синтез всех

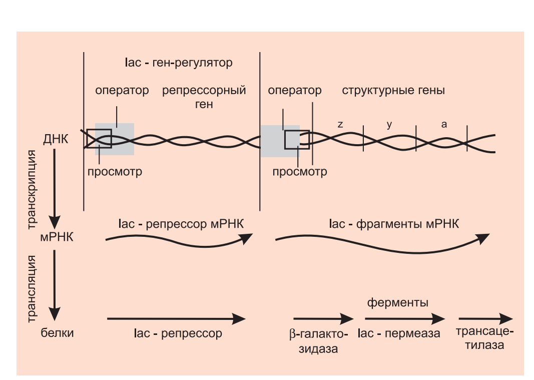


Рис. 4.7. Принципиальная схема генетической регуляции процессов индукции и репрессии для понимания их роли в токсикокинетике на альтернативных биомоделях

трех ферментов, необходимых для ее метаболизма. Механизм этого процесса объясняется следующим образом: в хромосоме *E. coli* присутствуют структурные гены (z, y, α), кодирующие эти три фермента. Эти гены включаются соседним операторным геном. Операторный ген находится под влиянием двух факторов – репрессора и индуктора. Репрессор может существовать в двух формах – активной P и неактивной P'. Активная форма способна реагировать с операторным геном и препятствовать транскрипции структурных генов.

Репрессор представляет собой белок, образованный транскрипцией регуляторного гена I, и состоит из четырех субъединиц (каждая субъединица содержит 345 аминокислот и имеет молекулярную массу 37000). На поверхности репрессора существуют две бороздки, через которые белок может взаимодействовать с участками обеих цепей ДНК (содержащих около 28 оснований с характерной особой центральной симметрией, которая ответственна за вращательную симметрию, обеспечивающую связывания репрессора) и ингибировать транскрипцию (рис. 4.8). С другой стороны, репрессор может взаимодействовать с низкомолекулярной молекулой – *индуктором*. Благодаря этому взаимодействию репрессор превращается в неактивную форму P' (возможно, это происходит в результате изменения конформации). Эта неактивная форма уже не может взаимодействовать с операторным геном и, следовательно, препятствовать транскрипции структурных генов. Это происходит в том случае, когда должен начаться синтез фермента (рис. 4.9).



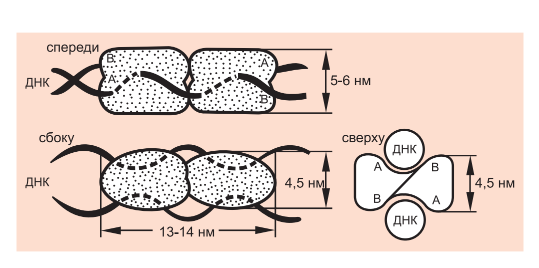




Рис. 4.8. Взаимодействие двух цепей ДНК с поверхностью репрессора и схема, отражающая механизм его возможной инактивации в процессе альтернативной токсикокинетики

Транскрипция начинается в районе ДНК, который называется *промотором* (последовательность оснований этого участка уже известна). В этом участке связывается РНК-полимераза и начинается транскрипция (синтез мРНК). Для синтеза необходим цАМФ, который образует активный комплекс со специфическим белком (САР-белок, активирующий катаболитный ген) и стимулирует транскрипцию. Отсутствие цАМФ препятствует началу транскрипции. Истинным индуктором в *E. coli* служит 1,6-аллолактоза, изомер лактозы. Она синтезируется из лактозы реакцией, катализируемой β-галактозидазой. Принцип регуляции с помощью индукции и репрессией является примером клеточной



экономии. Клетка синтезирует только те белки (ферменты), которые необходимы в данных условиях. Такой тип регуляции часто встречается в микроорганизмах, но может присутствовать и в более сложных живых системах, что делает его еще одним объектом биомоделирования.

В этом разделе мы хотели бы еще раз подчеркнуть, что, несмотря на некие различия регуляторных процессов фармакокинетики и токсикокинетики, фундаментальные основы их едины. Ферменты и коферменты ускоряют биологические реакции, снижая энергию активации и не изменяя положения равновесия как в отношении лекарств, так и токсикантов. В том и другом случае каждая ферментативная реакция характеризуется константой Михаэлиса K_m.





При данной концентрации фермента скорость реакции зависит от концентрации субстрата. Графически зависимость скорости от концентрации субстрата описывается гиперболой, при низких концентрациях субстрата реакция имеет первый порядок, при высоких – нулевой.

Рис. 4.9. Схема регуляторных процессов индукции, репрессии и депрессии как пример клеточной экономии при защите от чужеродных факторов, включая токсиканты

Этот факт был использован Михаэлисом и Ментен для создания в 1913 г. фундаментальной теории ферментативной кинетики. В основе теории лежит предположение о том, что в процессе ферментативной реакции образуется фермент-субстратный комплекс, который подвергается химической реакции и разрушается затем до свободного фермента и продуктов реакции (уравнение (4.1)).

$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP$$

$$[Et]-[ES]+S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E+P \qquad (4.1)$$

$$V_1 = k_1[S]([E] - [ES])$$

$$V_2 = k_2[S]([E] + k_{-1}\,[ES])$$

Характерная для каждой ферментативной реакции величина константы Михаэлиса K_m может быть определена следующим образом.

Концентрация свободного фермента после образования комплекса равна $[E] = [E_t] - [ES]$. Общая скорость реакции зависит от скоростей образования и распада комплекса ES. Способность фермента образовывать комплекс с продуктами реакции обычно незначительна. В состоянии равновесия скорость v_1 образования комплекса ES и скорость v_2 его распада одинаковы (уравнение (4.2)).

$$k_1([E_t - ES])[S] = k_2[ES] + k_{-1}[ES]. \qquad (4.2)$$

Скорость образования продукта описывается уравнением $v_1 = k_2[ES]$; подставляя в это уравнение величину $[ES]$ из уравнения (4.4), получаем уравнение (4.5).

$$\frac{([E_t - ES])[S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = K_m. \qquad (4.3)$$




$$[ES] = \frac{[E_t]\cdot[S]}{K_m + [S]} \qquad (4.4)$$

$$V = \frac{k_2[E_t][S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \qquad (4.5)$$

Максимальная скорость реакции V_{max} достигается при высокой концентрации субстрата, когда все молекулы фермента насыщены субстратом. Следовательно, $[ES] = [E_t]$, и справедливо:

$$V_{max} = k_2[ES] = k_2E_t. \qquad (4.6)$$

Уравнение (4.5) может быть теперь переписано с использованием указанного выражения V_{max}. Константа K_m может быть вычислена, если известны концентрация субстрата, скорость реакции и максимальная скорость (уравнение (4.7)).

$$K_m = [S]\left(\frac{V_{max}}{v} - 1\right). \qquad (4.7)$$

Если $v = \frac{V_{max}}{2}$, можно использовать уравнение $K_m = [s]$, из которого видно, что K_m имеет размерность концентрации.

Величина K_m зависит от типа субстрата, pH реакционной смеси и температуры. Если фермент катализирует превращения нескольких близких субстратов, каждому субстрату будет соответствовать соб-



ственная величина K_m. В первом приближении реакция протекает тем быстрее, чем ниже K_m. В этом суть модели Михаэлиса–Ментен.

Рассмотренные аспекты токсикокинетики не претендуют на полноту освещения проблемы. Наша цель заключалась в придании изложению цели поиска новых исследовательских горизонтов сравнительной кинетики токсикантов и лекарств.

Стратегии токсикопротеомики

Предпосылками для многозначных токсико-протеомических стратегий являются фракционные методы для функциональных субпротеом, плотных функционалов и дифференциальный физиологический контроль материала клеточной культуры или модели животных, использованных как субстрат протеомного анализа*. Это трудоемкий, сложный, но перспективный путь, указывающий, как из многих тысяч протеиновых пятен, определенных из заданного биологического объекта, может быть отобрано, идентифицировано и валидировано небольшое число *критических* суррогатных *биомаркеров*, основанное на количественном дифференциальном протеиновом представлении о токсичности [16].




Метод, которым можно получить достаточное разрешение – двухмерный полиакриламидный электрофорез (2D-PAGE). *Альтернативные методы*, такие, как жидкостная хроматография в непосредственной связи с масс-спектрометрией (LC-MS), основанные на чипах разделения на фракции, могут только выделить несколько тысяч протеиновых или пептидных видов. Они могут также разбавить критические примеры информации, сфокусировав внимание на ясных и нерепрезентативных пептидных видах во многих возможных посттрансляционных изоформах, появляющихся из заданной мРНК, то есть определенных цистеинсодержащих пептидах.

Воспроизведение 2D-геля, программное обеспечения для анализа пятен и ряд стандартных методов определения протеинов в 2D-гелях позволят разработать количественное и дифференциальное протеиновое представление, полученное специальными методами с радиоактивными метками и последующим применением подходящих технологий. Идентификация точной молекулярной информации, относящейся к механизмам, лежащим в основе токсических и побочных эффектов лекарственных действий, составляет суть *стратегии токсикопротеомики*.

В результате достижений генной инженерии, всестороннего анализа протеинов и развития протеомики понятно, что физиологическая

* Подробнее аспекты протеомики изложены в главе 6.





деятельность означает динамику, многомерное взаимодействие миллионов различных белковых молекул внутри системы с высочайшей организацией и корреляцией [7]. Изучение и сокращение этой неисчислимой сложности позволяет надеяться на скрининг новых лекарственных форм, изучение воздействия и *молекулярной токсикологии* [43]. Это всегда требует точных знаний специфических *ключевых белковых изоформ* со специфическими посттрансляционными модификациями, очень часто со специфической кинетикой и контекстными взаимодействиями молекул.

NB! Прямой анализ природных молекулярных архитектур и взаимодействий является критическим для развития *инновационных лекарств*, их валидации и оптимизации, так как циклы выражения мРНК и протеинов весьма ограничены [24].

Причиной является динамическое изменение посттрансляционных модификаций, которые определяют функции, то есть различные фосфорилирующие состояния рецепторов или энзимов, а также такие кинетические аспекты, как время жизни протеинов, закодированное в их относительных N-терминальных аминокислотах. Представления, основанные на скрининге пропускной способности генов или РНК в оценке токсичности лекарств, также как рекомбинантный протеомный подход, начинают использоваться в токсикомоделировании.





NB! Метаболические, физиологические и патофизиологические взаимодействия весьма гибкие, а значит, действие токсикантов и лекарственных средств зависит от тонких и сложных условий на уровне белка. Очевидно, только прямой и всесторонний анализ переноса природных протеинов обеспечит перспективы достоверного и соответствующего скрининга и контроля токсичности лекарств.

Огромные и динамически сложные *протеиновые изоформы* могут быть реально уменьшены до нескольких ключевых суррогатных биомаркеров с адекватным количественным и дифференциальным анализом протеиновых объектов [44]. 2D-PAGE обеспечивает качественную технику анализа объектов, а точную информацию о молекулах получают с помощью автоматической масс-спектрометрии. Это открывает перспективы для всестороннего понимания молекулярного уровня действия цитотоксинов и лекарств или их составляющих в действии, также как улучшения качества и скорости данных, полученных из моделей *in vitro*, например, моделей эмбриональных стволовых клеточных культур человека. Эти модели могут быть использованы для создания оптимально соответствующих и быстрых «рецепторов протеиновых изоформ» для условий цитотоксичности при скрининге лекарств, относительной клеточной полиферации, а также в токсикомоделировании.





Компьютерное моделирование

Современные методы *компьютерного моделирования* позволили разработать алгоритмы и программы для прогноза ожидаемой токсичности лекарств и эффектов их воздействия на здоровье человека. Эти компьютерные программы получили обобщенное название *моделей количественных соотношений* между *структурой – активностью* (Quantitative Structure-Activity Relationship – QSAR models) и структурой токсичности (QSTR models).

Модель TOPKAT для изучения на крысах пероральных препаратов содержит 19 моделей QSAR, данные из этих моделей были получены для обработки экспериментальных данных по летальным дозам (LD_{50}) на основе оценки 4000 химических веществ. Каждая *количественная модель определения структуры токсичности QSTR* оценивает LD_{50} для крыс по пероральным препаратам для определенного набора химических средств. Модель TOPKAT для изучения на крысах препаратов, применяемых в виде ингаляций, содержит 5 моделей QSAR, и данные по всем этим моделям были получены в эксперименте по *средним летальным концентрациям* LC_{50} для почти 650 химических веществ. В модели время проведения эксперимента было задано (0,5-14 часов), при этом время окончания эксперимента представлено в логарифмической шкале, а концентрация *C* в мол/$м^3$. Химические вещества были сгруппированы в 5 классических групп: простые бензолы, гетероароматические и сложные бензолы, алициклы, ациклы с галогенами, и ациклы без галогенов. Каждая QSTR-модель оценивает острую LC_{50} для крыс по специфическому классу химических веществ в единицах моль/$м^3$/час [62].




В отчете международного семинара по методам *in vitro* для оценки системы острой токсичности (Report of the International Workshop on *in vitro* Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity) указывается, что для оценки острой токсичности нет необходимости проводить тесты для выявления всех специфичных эффектов по влиянию на органы в моделях *in vitro*. Вместо этого, может быть достаточно, провести тестирование энергетического метаболизма и способности химических веществ нарушать функции эпителиального барьера. Кроме того, не существует методов *in vitro* для прогноза острой токсичности в опытах с ингаляциями, хотя некоторые модели в настоящее время находятся на стадии развития и компьютерного моделирования.

NB! В настоящее время не существует подходящих альтернативных методов для всесторонней оценки биокинетических факторов, а также токсико- и фармакокинетики, которые полностью исключали бы животных.

Классические подходы необходимо использовать в комбинации с альтернативными оценками определения точек окончания эксперимента, в соответствии со стратегией развития схем новых методов, включая острую токсичность [20]. В любом случае, обозримое будущее не сулит полную замену лабораторных животных альтернативными моделями, хотя научные тенденции альтернативного и компьютерного моделирования и желания исследователей вселяют надежду на прогресс в этой области знаний.

Литература

1. *Альберт А.* Избирательная токсичность. В 2 т. – *М.: Медицина, 1989.*
2. *Гуськова Т.А.* Токсикология лекарственных средств. – *М., 2003.*
3. *Капанадзе Г.Д., Ашуев Ж.А.* Светлогорская популяция мини-свиней // *Биомедицина № 6, с. 71-80, 2007.*
4. *Каркищенко Н.Н.* Общие закономерности действия психотропных средств // *Фармакол. и токсикол., № 5, с. 45, 1986.*
5. *Каркищенко Н.Н.* Классические и альтернативные модели в лекарственной токсикологии // *Биомедицина № 4, с. 5-23, 2006.*
6. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. Т.1. Основы биомедицины и фармакомоделирования. – *М.: Изд-во ВПК, 320 с., 2007.*




7. *Каркищенко Н.Н., Куликова О.Н.* Изучение роли кислых низкомолекулярных белков головного мозга крыс при развитии агрессивного поведения // В сб. «Проблемы нейрокибернетики». – *Ростов-на-Дону, с. 88, 1983.*
8. *Каркищенко Н.Н., Хайтин М.И.* О путях совершенствования скрининга нейрофармакологических веществ // В кн. «Нейрофармакология (новые препараты в неврологии)». – *Ленинград, 1980.*
9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2-е изд., перераб. и доп. – *М.: Медицина, 832 с. 2005.*
10. *Albert A.* The physico-chemical basis of therapy. *9th Edition*, *London-NT, 2007.*
11. *Balls M., Fentem J.H.* The on-going process to replace the LD_{50} test // *Human Innovations and alternatives, 7, 544-547, 1993.*
12. *Balls M.* Why modification of the LD_{50} test will not be enough // *Laboratory Animals, 25, 198-206, 1991.*
13. *Borenfreud E., Puerner J.* A simple quantitative procedure using monolayer cultures for citotoxicity assays (HTD/NR-90) // *J. Tissue Culture Methods, 9, 7-9, 1984.*
14. *Borenfreud E., Puerner J.* Toxicity determination *in vitro* by morphological alternations and neutral red absorption // *Toxicology Letters 24, 119-124, 1985.*
15. *Clemedson C., McFarlane-Abdulla E., Andersson M. et al.* MEIC evaluation of acute systemic toxicity: Part I. Methodology of 68 *in vitro* assays used to test the first 30 reference chemicals // *ATLA, 24, 251-272, 1996.*



16. *Dierickx P.* Cytotoxicity testing of 114 compounds by the determination of the protein content in Hep G2 cell cultures // *Toxicology in vitro, 3, 189-193, 1989.*
17. EEC Council Directive 67/548/EEC of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labeling of dangerous substances // *Official J. the European Economic Community, 196, 1-98, 1967.*
18. Executive Summary // *ATLA, 33, Suppl. 1, 7-18, 2005.*
19. *Genshow E., Spielmann H., Scholz G. et al.* The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models // *ATLA, 30, 151-176, 2002.*
20. *Gribaldo L., Gennari A., Blackburn K. et al.* Acute Toxicity // *ATLA, 33, Suppl. 1, 27-34, 2005.*
21. *Halberg F. et al.* Toward phase zero preclinical and clinical trials chronobiologie designs and illustrative application // *University of Minnesota. Chronobiology Seminar Series, 83-157, 1992.*
22. *Heimann R., Rice R.H.* Polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity and induction of metabolism in cultivated esophageal and epidermal keratinocytes // *Cancer Research, 43, 4856, 1983.*
23. ICCVAM. Report of the International Workshop on *In Vitro* Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity // *NIH Publication No. 01-4499, 370 pp. Research Trianglee Park. NC. USA: NIEHS, 2007.*


24. *Jansen R.C., Nap J.P., Mlynarova L.* Errors in genomics and proteomics // *Nature Biotechnology, 20, 19, 2002.*
25. *Kangas L., Gronroos M., Nieminen A.L.* Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluation cytotoxicity agents *in vitro* // *Medical Biology, 62, 338-343, 1984.*
26. *Karkischenko N.N., Maklakov J.S., Stradomsky B.V.* Clinical pharmacology preventive motion sickness // *Abstr. of 14th Symp. on clin. pharm., Berlin, p. 82, 1989.*
27. *Karkischenko N.N., Maklakov J.S.* The problem of pharmaco-chemical radiation protection of space crew during long turn space flight // *Abstr. of Int. Symp. of Radiat. Protect. Beijing, China, (E12), p. 71, 1989.*
28. *Karkischenko N.N., Pchelintsev S.U.* Designing of the drugs based on cytokines with determined pharmacokinetical properties // *Eur. Cytokine Ntw., 11, Nov., p. 148, 2000.*
29. *Karkischenko N.N., Pchelintsev S.U., Denisov L.A.* Perspectives of α2-interferon usage for immunobiological correction of postvaccinal reactions // *7th Int. Symp. «Chem. and biol. warfare agents», Stockholm, Sweden, 15-19 June, 2001, p. 214, 2001.*
30. *Liebsch M., Curren R., Fentem J.* Guidance document on using *in vitro* data to estimate *in vivo* starting doses for acute toxicity // *NIH Publication 01-4500. Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences (Accessed 8.10.02) 2002.*

31. *Liebsch M., Spielman H.* Balb/c 3T3 cytotoxicity test // *Methods and Molecular Biology, Vol. 43, 177-187, 1995.*
32. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the folin phenol reagent title // *J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951.*
33. *Nicholson A., Sandler J. Seidle.* An evaluation of the US High Production Volume (HPV) Chemical-testing Programme: A Study in (Ir)Relevance, Redundancy and Retro Thinking // *ATLA, 32, Suppl. 1A, 335-341, 2004.*
34. *OECD.* Guidelines for the Testing of Chemicals No. 401: Acute Oral Toxicity (Deleted in 2002), 7 pp. – *Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development, 2002.*
35. *OECD.* Guidence Document for the Development of OECD GuideLines for Testing of Chemicals // *Environmental Monographs No. 76, OECD, Paris, 1993, reprinted 1995.*
36. *OECD.* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19: Guidance Document on the Recognition Assessment and Use of Clinical Signs as Human Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, 39 pp. – *Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development, 2000.*
37. *OECD.* OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure, 14 pp. – *Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development, 2001.*




38. *OECD.* OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, 14 pp. – *Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development, 2001.*
39. *OECD.* OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure, 26 pp. – *Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development, 2001.*
40. *OECD.* Draft Test Guidline on Acute Toxicity – Fixed Dose Procedure, 24pp. – *Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development, 2004.*
41. *OECD.* Guidelines for the testing of Chemicals // *ATLA, 33, Suppl. 1, 223-227, 2005.*
42. *Organization* for Economic Cooperation and Development. OECD Guidelines for the testing of Chemicals. – *Paris, France: OECD, 2002.*
43. *Prieto P., Clemedson C., Meneguz A. et al.* Subacute and Subchronic Toxicity // *ATLA, 33, Suppl. 1, 109-116, 2005.*
44. *Schrattenholz A.* Proteomics: how to control highly dynamic patterns of millions of molecules and interpret changes correctly? Drug Dicovery Today // *Technologies, 1, 2004.*
45. *Schrattenholz A., Klemm M., Cahill M.* Potential of comprehensive toxico-proteomics: quantitative and differential mining of functional proteoms from native samples // *ATLA, 32, Suppl. 1A, 123-131, 2004.*
46. *Schulte C., Nagel R.* Testing acute toxicity in the embryo of zebrafish, Brachydanio rerio, as an alternative to the acute fish test: preliminary results // *ATLA, 22, 12-19, 1994.*



47. *Shrivatsava R., Delomenie C., Chevalier A. et al.* Comparison of *in vivo* acute lethal potency and *in vitro* cytotoxicity of 48 chemicals // *Cell Biology and Toxicology 8, 157-170, 1992.*
48. *Shrivatsava R., John G.W., Rispat G. et al.* Can the *in vivo* maximum tolerated dose be predicted using *in vitro* techniques? A working hypothesis // *ATLA, 19, 393-402, 1991.*
49. *Spielman H., Genshow E., Liebsch M., Halle W.* Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD50) testing in the Up and Down Procedure (UDP) from cytotoxicity data // *ATLA, 27, 957-966, 1999.*
50. *Spielmann H., Genshow E., Liebbsch M., Halle W.* Determination he starting dose for acute oral toxicity (LD50) testing in the Up and Down Procedure (UDP) from cytotoxicity data // *ATLA, 27, 957-966, 1999.*
51. *Sveden O.* The minipig in toxicology // *Exp. and Toxicol. Pathology, 2006.*
52. *Trevan J.W.* The error of determination of toxicity// *Proceedings of the Royal Society (London). Series B 101, 483-514, 1927.*
53. *United* Nations Economic Commission for Europe (UN/ECE). Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), 6 pp. – *New York, NY, USA, and Geneva, Switzerland: United Nations, 2003.*
54. US Environmental Protection Agency. The Use of Structure-Activity Relationships (SAR) in the High Production Volume Chemical Challenge Programme. – *Washington, DC, USA: US EPA, 2000.*




55. US Environmental Protection Agency. Supplemental Acute Toxicity Protocol. *Washington, DC, USA: EPA, 2001.*
56. US Environmental Protection Agency. Chemical Right to Know. *Washington, DC, USA: EPA, 2002.*
57. US Environmental Protection Agency. Ecological Structure Activity Relationships. *Washington, DC, USA: EPA, 2002.*
58. US National Toxicology Program Interagency Committee for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods. Report of the International Workshop on *in vitro* Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity, 412 pp. NIH Publication 01-4499 // *Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences, 2007.*
59. *Van der Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., et al.* The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test // *Food and Chemical Toxicology 28, 469-482, 1990.*
60. *Wakuri S., Izumi J., Sasaki K., Tanaka N., Ono H.* Cytotoxicity study of 32 MEIC chemicals by colony formation and ATP assays // *Toxicity in Vitro, 7, 517-521, 1993.*
61. *Zbinden G. & Flury-Roversi M.* Significance of the LD50 test for the toxicological evaluation of chemical substances // *Archives of Toxicology 47, 77-99, 1981.*
62. *Zuang V., Alonso M.A., Botham P.A. et al.* Skin irritation and corrosion // *ATLA, 33, Suppl. 1, 35-46, 2005.*